



КОНТРОЛЬ pH КАК ИНДИКАТОР ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ (МОДЕЛЬ НА ПРИМЕРЕ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*)

Р.П. Тренкеншу

ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»,
РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2
E-mail: r.trenkenshu@rambler.ru

Рассматривается возможность оценки плотности культур микроводорослей по величине pH, которая зависит от концентрации и форм элементов питания, необходимых для роста клеток. На основе механизма ассимиляции углерода клетками цианобактерии *Arthrospira platensis* построена упрощенная модель, связывающая долю доступного для роста клеток углерода в среде с величиной pH культуры. Используя полученное уравнение удалось сделать оценку доли усвоенного клетками углерода при различных значениях pH культуры. Модель с хорошей точностью описывает экспериментальные данные.

Ключевые слова: микроводоросли, культивирование, плотность, pH, ассимиляция углерода, моделирование, *Arthrospira*.

Поступила в редакцию: 21.01.2023.

Введение. Одной из ключевых задач при научном или производственном культивировании микроводорослей является оценка плотности культур [1]. Обычно плотность культуры измеряется в концентрациях клеток или биомассы [2]. Прямое измерение этих параметров требует значительных затрат времени, расходных материалов и использования специального оборудования. Поэтому в практике чаще всего используют косвенные методы.

Важным моментом при выборе способа оценки биомассы является возможность использовать экспресс-методы, позволяющие в режиме реального времени контролировать и управлять процессами роста культур. К настоящему времени таким, наиболее разработанным и часто используемым способом, является оптический метод [1]. Однако микроводоросли сильно окрашены из-за высоких концентраций пигментов, что приводит к некоторому искажению данных по концентрации биомассы [3]. При этом оптические приборы стоят недешево и обеспечивают только дискретные измерения. Для непрерывного контроля необходимы специальные датчики оптической плотности [4].

В сложившейся практике культивирования микроводорослей обычно контролируют показатель pH свежей питательной среды и культуры. Это связано с тем, что оптимальные значения pH у разных видов микроводорослей могут значительно отличаться [1, 5, 6], также, как и у других микроорганизмов [7]. В зависимости от формы источника биогенных элементов в питательной среде рост культуры сопровождается либо понижением, либо повышением pH культуры [1, 6–8].

В качестве примера нормального роста микроводорослей при повышенных уровнях pH можно привести цианобактерию *Arthrospira (Spirulina) platensis*, (далее – спирулина), которая относится к хорошо изученным видам микроводорослей [9].

Обычно при выращивании спирулины используется питательная среда Заррук [10]. Особенностью среды является высокая щелочность из-за высокой концентрации гидрокарбонатов натрия, которые обеспечивают углеродом оптимальный рост спирулины.

В процессе роста микроводорослей клетки ассимилируют растворенные в питательной среде элементы питания,

что приводит к изменению pH культуры. Причем наибольший вклад в изменение pH вносит углерод, который составляет половину сухой массы клеток, а спирулина при фотоавтотрофном росте может ассимилировать углерод только в виде HCO_3^- [11–14].

Кроме того, при экспериментальном изучении влияния различных концентраций нитратного азота в среде было обнаружено, что динамика pH в процессе роста плотности культуры не зависит от азота в широком диапазоне концентраций и практически одинакова во всех опытах [15]. Это может означать, что основной вклад в изменение pH вносит ассимиляция углерода клетками.

Разработка математической модели связи pH с плотностью культуры микроводорослей на основе механизма ассимиляции углерода является предметом предлагаемой работы.

Материалы и методы. В качестве экспериментальных данных в статье использованы результаты работы [15].

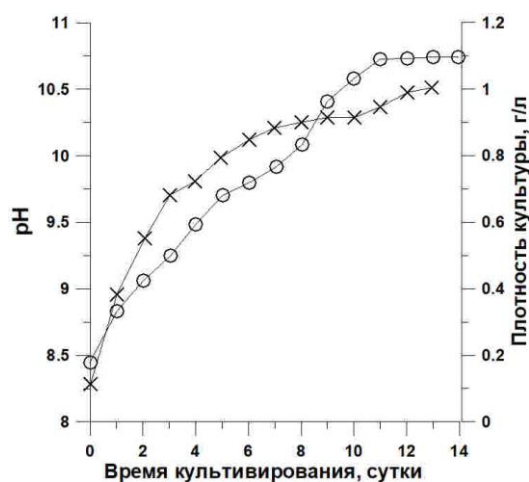


Рис. 1. Динамика концентрации биомассы (X) и pH (O) культуры спирулины в опыте с половинной средой Заррук

Fig. 1. Dynamics of biomass concentration (X) and pH (O) of spirulina culture in the experiment with half-medium Zarrouk

На рис. 1 представлены результаты, полученные в опытах по изучению влияния разных разведений питательной сре-

ды Заррук на рост плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Gomont) [16].

Оценка коэффициентов модели и детерминация данных осуществлялась с помощью программы *Grapher-3*.

Результаты и обсуждение. Рис. 1 наглядно демонстрирует весьма сложное соотношение между плотностью и pH культуры.

Для построения модели связи плотности (концентрации биомассы) с pH культуры воспользуемся известными положениями.

Формы углерода в растворах. В питательной среде Заррук для спирулины источником углерода служит бикарбонат натрия (16 г/л), который определяет pH среды в районе 8,2–8,3. В растворах соотношение форм углерода может быть представлено в виде CO_2 , HCO_3^- и CO_3^{2-} , а pH зависит от соотношения их концентраций [17]. Это позволяет по величине pH среды в культуре рассчитать *in silico* концентрацию различных форм углерода [18]. Воспользуемся расчетом по данной программе для HCO_3^- , приведённом в работе [19], в которой изучался подводный фотосинтез (рис. 2).

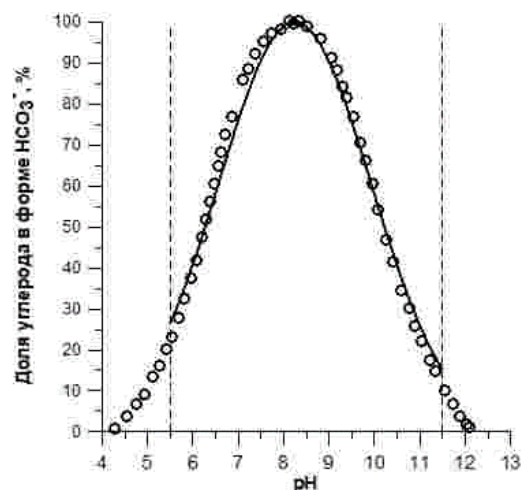


Рис. 2. Зависимость содержания углерода в форме HCO_3^- в растворе. Точки – по данным из работы [19], сплошная линия – модель в виде Гауссианы

Fig 2. Dependence of the carbon content in the form of HCO_3^- in solution. Points are according to the data from the work [19], the dashed line is a model in the form of Gaussian curve

Как видно из приведенного рисунка, при pH около 8,2-8,3 практически весь углерод находится в форме HCO_3^- , Как и следовало ожидать, величина pH в максимуме HCO_3^- практически совпадает с pH питательной среды Заррук.

В этой форме углерод усваивается клетками спирулины, обеспечивая фотоавтотрофный синтез биомассы.

Механизм ассимиляции углерода. Спирулина при фотоавтотрофном росте ассимилирует углерод с участием клеточной карбоангидразы, которая превращает одну молекулу HCO_3^- в CO_2 и OH^- . CO_2 в цикле Кальвина расходуется на синтез биомассы и обеспечивает рост культуры. OH^- остается в среде и во взаимодействии еще с одной молекулой HCO_3^- образует CO_3^{2-} [11–14].

Т.е., синтез биомассы сопровождается ассимиляцией одной молекулы углерода и переводом ещё одной молекулы в неусваиваемую клетками форму.

Математическая модель. В качестве функции для описания доли различных форм углеродных соединений (C/C_m) в растворах предлагается полуэмпирическое уравнение, аналогичное уравнению Гаусса

$$\frac{C}{C_m} = \exp(\sigma(pH - pH_m)^2).$$

В этом уравнении максимальное содержание данной формы соединения (C_m) наблюдается при $pH = pH_m$, σ – нормирующий коэффициент.

Для приведенных на рис. 2 данных модель имеет вид

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_m} = 100\% e^{-0,183(pH-8,2)^2}.$$

Как видим, уравнение с хорошей точностью (коэффициент детерминации $R_{sq} = 0,989$) описывает связь HCO_3^- с величиной pH раствора в широком диапазоне значений. Причем максимальное значение $[\text{HCO}_3^-]_m$ наблюдается при $pH_m = 8,2$. Однако, точность описания

значительно снижена при $pH < 5,5$ и $pH > 11,5$, т.е. диапазон возможности использования уравнения ограничен этими пределами (5,5–11,5).

В питательной среде Заррук величина максимального содержания доступного для роста спирулины углерода наблюдается при pH приблизительно равном 8,25, даже при двукратном и четырехкратном разбавлении [15]. Это позволяет использовать модель для оценки концентрации углерода в культурах микроводорослей.

Применение модели. Перед применением полученного уравнения для описания экспериментальных данных необходимо сделать важное замечание. Диапазон pH, при которых возможно использование полученного уравнения, может быть ограничен из-за изменения химического состава клеток микроводорослей и культуральной среды.

Максимальное значение углерода в форме $[\text{HCO}_3^-]_m$ в питательной среде Заррук определяется концентрацией NaHCO_3 . В половинной среде Заррук, которая использовалась в приведенном на рис. 1 опыте содержалось 8 г/л NaHCO_3 или 5,81 г/л HCO_3^- или $C_m = 1,144$ г/л углерода.

Для этих условий уравнение можно записать в виде

$$C = 1,144 e^{-0,183(pH-8,2)^2}.$$

С потреблением части углерода на прирост биомассы (C_b), такая же часть углерода перейдет в неусваиваемую клетками форму, Т.е. общий баланс углерода можно записать в виде

$$C_m = C + 2C_b.$$

Отсюда находим содержание углерода в клетках

$$C_b = \frac{C_m - C}{2}.$$

Учитывая, что биомасса (B) большинства видов микроводорослей, выраженная в абсолютно сухом весе, содер-

жит 50% углерода [20], концентрацию биомассы можно выразить через содержание углерода в клетках

$$B = 2C_b.$$

$$B = C_m - C = C_m \left(1 - \frac{C}{C_m}\right).$$

Окончательно, имеем уравнение, связывающее плотность культуры с рН

$$B = C_m \left(1 - \exp(\sigma(pH - pH_m)^2)\right).$$

Подставляя значения коэффициентов, полученных ранее, имеем

$$B = 1,144(1 - e^{-0,183(pH-8,2)^2}).$$

Расчет по этому уравнению представлен на рис. 3.

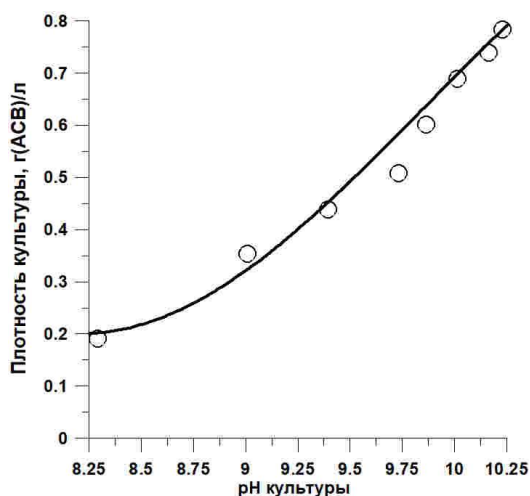


Рис. 3. Связь плотности спирулины и рН культуры. Светлые кружочки - экспериментальные данные из работы [15] сплошная кривая – модельный расчет.

Fig. 3. Relationship between the spirulina density and the culture pH. Light circles are experimental data from the work [15], solid curve is the model calculation

Как видно из представленных на рис. 3 экспериментальных данных предложенное уравнение хорошо описывает зависимость плотности культуры от рН в

относительно широком диапазоне значений.

Заметим, что полученное уравнение является следствием обратной зависимости рН культуры от её плотности, которая, в частности, позволяет дать оценку отклонения величины рН от положения рН_м, при котором наблюдается максимум углерода в форме, доступной для роста спирулины

$$pH - pH_m = \sqrt{\frac{1}{\sigma} \ln \frac{C}{C_m}}.$$

Заключение. В реальности рост микроводорослей сопровождается изменением рН культуры не только от ассимиляции углерода, но и других элементов питания. Поэтому модель должна быть дополнена корректирующими коэффициентами, учитывающими влияние поглощения клетками других биогенных элементов из среды. Это приведет к усложнению алгоритмов оценки биомассы по величине рН *in silico*, но значительно упростит и удешевит эту оценку по сравнению с другими техническими средствами.

Работа выполнена согласно госзадания "Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса" (№ 0556-2021-0004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Richmond A.* Handbook of microalgal mass culture. Boca Raton: CRC Press. 1986. P. 528.
2. *Владимирова М.Г., Семенов В.Е.* Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М: АН СССР. 1962. С. 60.
3. *Геворгиз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г.* Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культур // Экология моря. 2005. Вып. 70. С. 96–106.

4. Гулин А.С., Тренкешу Р.П. Модель конструкции микроводорослевой фотометрической ячейки // Системы контроля окружающей среды. 2021. № 1 (43). С. 79–86. <https://doi.org/10.33075/2220-5861-2021-1-79-86>.
5. Gabrielyan D.A., Gabel B.V., Sinetova M.A., Gabrielian A.K., Markelova A.G., Shcherbakova N.V., Los D.A. Optimization of CO₂ Supply for the Intensive Cultivation of *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 in the Laboratory and Pilot-Scale Flat-Panel Photobioreactors // *Life*. 2022, 12, 1469. <https://doi.org/10.3390/life12101469>.
6. Ifrim G.A., Titica M., Horincar G., Antache A., Baicu L., Barbu M., Guzmán J.L. Model Based Optimal Control of the Photosynthetic Growth of Microalgae in a Batch Photobioreactor. *Energies* 2022, 15, 6535. <https://doi.org/10.3390/en1518653>.
7. Pencheva D., Rumenkina M., Al-Djasem A., Iliev M., Karamihov V., Genova-Kalou P., Kantardj T. pH in cell biology, microbiology and biotechnology. P. 23–29. <https://www.researchgate.net/publication/276410167>.
8. Adamberg K., Valgepea K., Vilu R. Advanced continuous cultivation methods for systems microbiology // *Microbiology* 2015. Vol. 161. P. 1707–1719. DOI 10.1099/mic.0.000146.
9. Wonshak A. Outdoor Mass Production of *Spirulina*: The Basic Concept // *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. P. 79–101.
10. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Stech. Et Gardner). Geitler. Paris, 1966. P. 138.
11. Kamennaya N.A., Ahn S.E., Park H., Bartal R., Sasaki K.A., Holman H.Y., Jansson C. Installing extra bicarbonate transporters in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803. Enhances biomass production. // *Metabolic Engineering*. 2015. Vol. 29. P. 76–89.
12. Badger M.R., Price G.D. CO₂-concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution // *Journal of Experimental Botany*. 2003. Vol. 54, No. 383, P. 609–622.
13. Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects or engineering into plants // *Journal of Experimental Botany*. 2008. Vol. 59, No. 7, P. 1441–1461.
14. Лелеков А.С., Геворгуз П. Г. Моделирование динамики роста *Arthrospira (Spirulina) platensis* и pH среды в закрытой по углероду системе // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1113>.
15. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Тренкешу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina (Arthrospira) Platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях азотного питания // *Экология моря*. 2002. Т. 62. С. 61–66.
16. Guiry M.D., Guiry G.M. (2022). AlgaeBase. *Arthrospira platensis* Gomont, 1892. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=213728> on 2022-10-13.
17. Schwarzenbach G., Meier J. Formation and investigation of unstable protonation and deprotonation products of complexes in aqueous solution. *J. Inorg. Nuclear Chem.* 1958 8, P. 302–312.
18. Gutz I. G. R. (2012). CurTiPot - pH and Acid-base Titration Curves: Analysis and Simulation Software, Version 3.6.1 [Online]. Available at: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html> [accessed 16 Dec 2012 2013].
19. Pedersen O., Colmer T.D., Sand-Jensen K. Underwater photosynthesis of submerged plants – recent advances and methods // *Plant Physiology*. 2013. Vol. 4. P. 1–19. DOI: 10.3389/fpls.2013.00140
20. Lim YA, Chong MN, Foo SC, Ilankoon IMSK. Analysis of direct and indirect quantification methods of CO₂ fixation via microalgae cultivation in photobioreactors: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* 2021; 137:110579. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110579>.

**pH CONTROL AS AN INDICATOR OF THE MICROALGAE CULTURE DENSITY
(MODEL ON THE EXAMPLE OF ARTHROSPIRA PLATENSIS)**

R.P. Trenkenshu

The A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas of RAS, Sevastopol, Nachimov Av., 2
E-mail: r.trenkenshu@rambler.ru

The article focuses on the possibility of assessing the density of microalgae cultures by the pH value, which depends on the concentration and forms of nutrients necessary for cell growth. Based on the mechanism of carbon assimilation by the cells of the cyanobacterium *Arthrospira platensis*, a simplified model is constructed that relates the proportion of carbon available for cell growth in the medium to the pH of the culture. Using the resulting equation enables to assess the proportion of carbon absorbed by cells at different pH values of the culture. The model describes the experimental data with good accuracy. Keywords: microalgae, cultivation, density, pH, carbon assimilation, modeling, *Arthrospira*.

REFERENCES

1. Richmond A. Handbook of microalgal mass culture. Boca Raton: CRC Press, 1986, 528 p.
2. Vladimirova M.G. and Semenenko V.E. Intensivnaya kul'tura odnokletochny`x vodoroslej (Intensive culture of unicellular algae). M: AN SSSR, 1962, 60 p.
3. Gevorgiz R.G., Alisievich A.V., and Shmatok M.G. Ocenka biomassy` *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. po opticheskoy plotnosti kul'tur (Estimation of the biomass of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. by optical density of cultures). *Ekologiya morya*, 2005, Vol. 70, pp. 96–106.
4. Gulin A. S. and Trenkenshu R. P. Model` konstrukcii mikrovodoroslevoj fotometricheskoy yachejki (Design model of a microalgae photometric cell). *Sistemy kontrolya okruzhayushhej sredy*, 2021, No.1 (43), pp. 79–86. <https://doi.org/10.33075/2220-5861-2021-1-79-865>.
5. Gabrielyan D.A., Gabel B.V., Sinetova M.A., Gabrielian A.K., Markelova A.G., Shcherbakova N.V., and Los D.A. Optimization of CO₂ Supply for the Intensive Cultivation of *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 in the Laboratory and Pilot-Scale Flat-Panel Photobioreactors. *Life*, 2022, 12, 1469. <https://doi.org/10.3390/life12101469>.
6. Ifrim G.A., Titica M., Horincar G., Antache A., Baicu L., Barbu M., and Guzmán J.L. Model Based Optimal Control of the Photosynthetic Growth of Microalgae in a Batch Photobioreactor. *Energies* 2022, 15, 6535. <https://doi.org/10.3390/en151865>.
7. Pencheva D., Rumenkina M., Al-Djaseem A., Iliev M., Karamihov V., Genova-Kalou P., and Kantardj T. pH in cell biology, microbiology and biotechnology. 2013, pp. 23–29. <https://www.researchgate.net/publication/276410167>.
8. Adamberg K., Valgepea K., and Vilu R. Advanced continuous cultivation methods for systems microbiology. *Microbiology* 2015, Vol. 161, pp. 1707–1719. DOI 10.1099/mic.0.000146.
9. Wonshak A. Outdoor Mass Production of *Spirulina*: The Basic Concept. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997, pp. 79–101.
10. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Stech. Et Gardner). Geitler. Paris, 1966, 138 p.
11. Kamennaya N.A, Ahn S.E, Park H., Bartal R., Sasaki K.A., Holman H.Y., and Jansson C. Installing extra bicarbonate transporters in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Enhances biomass production. *Metabolic Engineering*, 2015, Vol. 29, pp. 76–89.
12. Badger M.R. and Price G.D. CO₂-concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 2003, Vol. 54, No. 383, pp. 609–622.

13. Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., and Long B.M. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects or engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*, 2008, Vol. 59, No. 7, pp. 144–1461.

14. Lelekov A.S. and Gevorgiz R.G. Modelirovanie dinamiki rosta *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* i rN sredy` v zakry`toj po uglerodu sisteme (Modeling of growth dynamics of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* and medium pH in a carbon-closed system). *Voprosy sovremennoj al`gologii*, 2017, No. 1 (13), URL: <http://algology.ru/1113>.

15. Drobeczkaya I.V., Minyuk G.S., Trenkenshu R.P., and Vyalova O.Yu. Rostovy`e i bioximicheskie xarakteristiki *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler pri razlichny`x usloviyax mineral`nogo pitaniya (Growth and biochemical characteristics of *Spirulina* (*Arthrospira*) *Platensis* (Nordst.) Geitler under various conditions of nitrogen nutrition). *Ekologiya morya*, 2001, Vol. 56, pp. 41–46.

16. Guiry M.D. and Guiry G.M. *AlgaeBase*. *Arthrospira platensis* Gomont, 1892. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=213728> on 2022-10-13.

17. Schwarzenbach G. and Meier J. Formation and investigation of unstable protonation and deprotonation products of complexes in aqueous solution. *J. Irtorg. Nuclear Chem.* 1958 8, pp. 302–312.

18. Gutz I. G. R. (2012). *CurTipot - pH and Acid-base Titration Curves: Analysis and Simulation Software*, Version 3.6.1 [Online]. Available at: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html> [accessed 16 Dec 2012 2013].

19. Pedersen O., Colmer T.D., and Sand-Jensen K. Underwater photosynthesis of submerged plants – recent advances and methods. *Plant Physiology*, 2013, Vol. 4, pp. 1–19. DOI: 10.3389/fpls.2013.00140.

20. Lim Y.A., Chong M.N., and Foo S.C. *Ilankoon IMSK*. Analysis of direct and indirect quantification methods of CO₂ fixation via microalgae cultivation in photobioreactors: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* 2021; 137:110579. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110579>.