



НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.273:573.6(262.5)

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЧЕРНОМОРСКОГО ГЕЛИДИУМА *GELIDIUM SPINOSUM* (S. G. GMELIN) P. C. SILVA (RHODOPHYTA)

© 2019 г. Б. Н. Беляев, Н. М. Береговая

Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия
E-mail: belyaevbob@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2018; после доработки 19.07.2018;
принята к публикации 18.03.2019; опубликована онлайн 31.03.2019.

Приведены результаты многолетних исследований условий культивирования красной черноморской водоросли *Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) в системах инженерного типа для повышения содержания в ней R-фикоэритрина. Защищённые патентами методики разработаны после изучения влияния на рост биомассы гелидиума ряда факторов (температура, освещённость и режим протока питательной среды, насыщаемой биогенами и углекислым газом) и способов борьбы с обрастаниями. Актуальность исследования определяется ценностью гелидиума как источника R-фикоэритрина — натурального пигмента, пищевого красителя, а также мощного и дорогого антиоксиданта, используемого в иммунной диагностике, микроскопии и цитометрии. Цель работы — оптимизировать условия культивирования черноморского гелидиума в береговых системах инженерного типа для увеличения выхода R-фикоэритрина с единицы площади культиваторов. В качестве материала использовали гелидиум из обрастаний скал и берегоукрепительных сооружений в районе Севастополя, который культивировали в лабораторной установке при температуре 15–27 °С и освещённости 10–25 клк в режиме 18 ч день : 6 ч ночь (06:00–00:00 и 00:00–06:00 соответственно) в вариациях протока питательной среды на основе фильтрованной черноморской воды с добавками поваренной соли, солей азота, фосфора, железа, магния и марганца. Урожай в экспериментах 2017 г. — $(96,2 \pm 8,8) \text{ г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$ сырой массы гелидиума. При минимальном урожае $87,4 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2}$, минимуме сухого вещества в 36 % и содержании в нём фикоэритрина до $12 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ выход R-фикоэритрина составит $378,6 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. В перспективе береговая система культиваторов глубиной 0,5 м и зеркальной площадью в 1 га при её работе 300 дней в году позволит получать продукцию не менее 1100 кг R-фикоэритрина.

Ключевые слова: макрофиты, гелидиум, культивирование, R-фикоэритрин, борьба с эпифитами, состав и подвижность питательной среды, температура, освещённость

Макрофиты обладают способностью извлекать питательные вещества из смеси морской и сточной воды. В 1970-х гг. крупномасштабные инженерные системы, предназначенные для культивирования этих растений на берегу, стали рассматривать с точки зрения пригодности для мелиорации среды [18]. Что касается гелидиума, его культивирование во всём мире традиционно вызывало большой интерес в связи с высоким содержанием (от 25 до 50 % сухого вещества) и качеством добываемого из него агара (намного более ценного по своим показателям, чем агар, получаемый из других макрофитов) [19, 20]. Широко распространено его использование в кулинарии, кондитерской промышленности и медицине (среди ценных свойств агара — укрепление суставов, а также разжижение крови и удаление из неё излишков холестерина). В настоящее время расфасованный

в мешки по 25 кг агар, который производится в разных странах от Чили до Японии, предлагается многими фирмами в России по цене от 1100 до 1950 руб. за килограмм [1]. Между тем более ценным компонентом гелидиума является R-фикоэритрин — натуральный пигмент, пищевой краситель, а также мощный антиоксидант, используемый в иммунной диагностике, микроскопии и цитометрии [17], стоимость которого — 3250–14000 долларов (примерно 182130–784560 руб.) за 1 грамм [15]. Максимальные запасы гелидиума, обнаруженные в Чёрном море в 1960-е гг., составляли лишь три тонны [13]. С учётом всего вышеизложенного был сделан вывод о целесообразности проведения исследований по культивированию красной черноморской водоросли (прежде всего как источника R-фикоэритрина) в системах инженерного типа.

Первый опыт культивирования гелидиума в ФГБУН ИМБИ с учётом установленного дальневосточными исследователями факта не сопряжения функций роста биомассы макрофита и накопления в ней специфических веществ [11] проводили с недельным циклом в два этапа:

- 1 — активный рост при ежедневном повышении начальной концентрации азота ($3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и фосфора ($0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) пропорционально увеличению биомассы;
- 2 — «отдых» при пониженной освещённости и температуре [12].

Этот способ не мог быть внедрён в практику из-за сильного обрастания гелидиума эпифитами. Такой приём для подавления эпифитов, как ежедневное обсушивание и импульсное питание, который с успехом был использован при разработке способа культивирования черноморской водоросли *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. [10], не давал требуемого эффекта при культивировании гелидиума, у которого ветви талломов в 1,2–1,5 раза тоньше, а значит, отношение площади поверхности к биомассе больше. При увеличении продолжительности обсушивания до 100 минут страдал и сам базифит: снижались темпы весового роста, в том числе из-за потери времени на обсушивание.

Гелидиум подвержен обрастанию эпифитами в процессе интенсивного культивирования. В связи с этим возник вопрос о возможности постоянного (круглогодичного) сохранения определённого объёма исходного материала в системах инженерного типа: это давало бы возможность запускать процесс независимо от погодных условий. Был проведён эксперимент по содержанию красной черноморской водоросли в лаборатории, состоящий из семи этапов [6]. На первом этапе гелидиум, собранный 05.10.2006, содержали в 250-литровом аквариуме с фильтрованной черноморской водой солёностью 17–18‰ в течение 112 суток при барботаже сжатым воздухом, температуре 10–12 °С и освещённости не более 0,3 клк. На последующих шести этапах (вплоть до 22.10.2007) гелидиум вовлекали в интенсивное культивирование в лабораторной установке с восемью рабочими объёмами [3] с подкормкой азотом, фосфором и железом, чередовавшееся с фазами «отдыха» в аквариуме. Это давало 100%-ную гарантию однородности экспериментального материала.

Путь борьбы с эпифитами был определён при исследовании влияния на продуктивность гелидиума такого фактора, как солёность: её повышение до 26–34‰ не только ингибировало эпифиты, но и увеличивало удельную скорость весового роста водоросли [4]. Кроме того, были повышены начальные концентрации азота (до $6 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и фосфора (до $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), и их дополнительно увеличивали ежедневно на 5–7% по мере наращивания биомассы. В качестве стимулятора роста использовали хлорное железо в виде $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в диапазоне концентраций $1,68\text{--}2,16 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, сваренное с $13\text{--}17 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ EDTA- Na_2 . Всё это в совокупности позволило увеличить урожай гелидиума с единицы зеркальной поверхности культиватора в 1,7 раза — с (56 ± 2) до $(97 \pm 6) \text{ г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$ — при уменьшении в 3,5 раза количества эпифитов. На этот способ культивирования гелидиума был выдан патент UA 96379 [16]. Между тем при увеличении удельной скорости весового роста гелидиума μ в 1,3 раза содержание R-фикоэритрина по упомянутой ранее причине [11] не превышало таковое в исходном свежем материале. Этот способ давал низкий [менее 0,56% от абсолютно сухого вещества (далее — АСВ)] выход R-фикоэритрина, поэтому были проанализированы результаты влияния на его содержание добавок двух форм железа — хлорного и сернокислого [7].

Во-первых, оказалось, что использование обеих добавок в качестве стимулятора роста биомассы приводило к уменьшению процентного содержания фикоэритрина по сравнению со средним нулевым вариантом $[(0,82 \pm 0,10) \%$ сухого веса], причём оно не восстанавливалось за время «отдыха» в аквариуме, через который не осуществляли проток питательной среды. Его среднее содержание для вариантов с хлорным железом составило $(0,48 \pm 0,08) \%$, а с сернокислым — $(0,67 \pm 0,10) \%$. Между тем при большем суммарном приросте за 33 дня биомассы гелидиума в трёх культиваторах с хлорным железом (23,03 г), чем в трёх культиваторах с сернокислым железом (20,77 г), общее количество R-фикоэритрина в вариантах с сернокислым железом было на 26 % выше.

Во-вторых, нерегламентированное повышение солёности питательной среды до 26‰ для подавления эпифитов, например с помощью поваренной соли, при производстве которой удаляют соединения марганца и магния, причисляемых к «металлам жизни» и совершенно необходимых при фотосинтезе (они активируют ферменты, участвующие в процессе фосфорилирования), приводит к уменьшению процентного содержания этих металлов в питательной среде по отношению к таковому ионов натрия и хлора. Это могло отрицательно повлиять на содержание R-фикоэритрина в культивируемом гелидиуме. Обнаружено, что добавки магния в диапазоне $80\text{--}120 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в питательную среду приводят к увеличению его содержания в водорослях в 1,5 раза [8]. Также выявлено, что добавки марганца в количестве $0,55 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в питательную среду, обогащённую азотом ($4,8 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), фосфором ($0,8 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), хелатированным железом ($0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) и магнием ($50 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), приводят к увеличению содержания R-фикоэритрина на 30 % [9].

Ежедневное приготовление новой питательной среды — довольно трудоёмкий процесс, и при постоянном протоке среды он не решает задачу оптимального обеспечения биогенами непрерывно увеличивающейся биомассы. Более того, установлено, что с её ростом при постоянном объёме питательной среды удельная скорость потребления азота в течение суток падает с 71 до $37 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}$, а фосфора — с 9,6 до $6,4 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}$ [5].

Анализ всех перечисленных недостатков и свежих экспериментальных данных лёг в основу разработки нового способа культивирования черноморского гелидиума.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили талломы черноморского гелидиума *Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) высотой 35–55 мм, традиционно собираемые вручную на глубине до 1 м с камней и берегоукрепительных сооружений вблизи радиобиологического корпуса ФГБУН ИМБИ (Чёрное море, Севастополь, б. Мартынова, б. Карантинная). Однородность талломов удостоверяли сотрудники отдела биотехнологий и фиторесурсов с. н. с. к. б. н. Евстигнеева И. К. и м. н. с. Танковская И. Н.

В промежутках между экспериментами материал содержали в 250-литровом аквариуме с протоком 0,5 объёма в сутки фильтрованной черноморской воды солёностью 17,5–18,0‰, при температуре 10–12 °С и дневной освещённости 0,2–0,5 клк. Эксперименты по поиску оптимальных условий культивирования гелидиума проводили с использованием математических методов планирования [2] на лабораторной установке с восемью рабочими объёмами ёмкостью 1,5 л со скошенным дном [3] в диапазоне температур 15–27 °С и освещённости 10–25 клк в режиме 18 ч день : 6 ч ночь (06:00–00:00 и 00:00–06:00 соответственно). Питательную среду на основе фильтрованной черноморской воды, солёность которой повышали до 26‰ с помощью поваренной соли, насыщали азотом от 2,4 до $8,54 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде KNO_3 или NaNO_3 ; фосфором — от 0,8 до $1,77 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде KH_2PO_4 ; железом — от 0,35 до $1,39 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ или $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в сочетании с 8–17 мг EDTA- Na_2 на 1 г соли; марганцем — до $0,55 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; кобальтом — до $0,3 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; цинком — до $0,06 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; магнием — от 40 до $120 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ в виде $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

В качестве выходных параметров использовали прирост биомассы, содержание R-фикоэритрина и среднюю удельную скорость весового роста, которую вычисляли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t}, \quad (1)$$

где W_0 — начальная масса, г;

W_t — конечная масса, г;

t — время между взвешиваниями, сутки.

Концентрацию R-фикоэритрина определяли по стандартной методике [14]. Солёность измеряли зондом HI98130 Combo фирмы HANNA Instruments [4] с точностью $\pm 2\%$ ($\pm 0,35\%$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и в способе по патенту UA 96379, недельное циклическое выращивание включало фазы «отдыха» в аквариуме при температуре 10–12 °С и дневной освещённости 0,2–0,5 клк, приготовление питательной среды на основе фильтрованной черноморской воды, доведённой до солёности 26‰, засев среды фрагментами гелидиума с начальной плотностью 2,0–2,5 кг·м⁻² при освещённости на поверхности воды 18–20 клк в режиме 18 ч день : 6 ч ночь, температуре питательной среды 15–19 °С в феврале, марте и ноябре, 19–23 °С в апреле, мае, сентябре и октябре, 23–27 °С в летние месяцы, удержание её в течение 36–48 ч от начала цикла вблизи верхней границы диапазона, оптимального для текущего периода, и снижение её к концу цикла. Такой приём предполагал «пробуждение» водоросли после «отдыха» при пониженной температуре и освещённости.

Не изменился и режим барботирования среды сжатым воздухом, обеспечивающий объёмное вращение водорослей, поддержание рН среды на уровне 7,9–8,2 путём добавления углекислоты из расчёта 25–30 г на 1 кг водорослей в сутки, проток питательной среды, которую насыщают биогенами в виде солей, содержащих азот, фосфор и хелатированное железо, предварительно проваренное в дистилляте совместно с EDTA-Na₂, сбор урожая и отбор для последующих циклов наиболее целых и чистых от обрастаний водорослей.

Существенное отличие разрабатываемого способа от других заключалось в изменении состава питательной среды — в замене хлорного железа на серноокисное и в добавлении солей марганца и магния при использовании пищевой соли NaCl для повышения солёности питательной среды. Кроме того, значительно была упрощена технология. Вместо ежедневного приготовления новых порций добавок питательных веществ в среду, возрастающих пропорционально росту биомассы гелидиума, была определена их оптимальная исходная концентрация, и в зависимости от начальной плотности посадки гелидиума задавался проток питательной среды от 1,0–1,7 объёма в сутки в начале цикла до 1,6–2,2 — в его конце.

Эксперимент по этому способу выращивания гелидиума с недельным циклом проводили 56 суток (с 27 февраля по 24 апреля 2017 г.) с материалом, который собрали в сентябре — октябре 2016 г. из обрастаний волнолома перед зданием радиобиологического корпуса ФГБУН ИМБИ и содержали в проточном 250-литровом многосекционном аквариуме при дневной освещённости 0,2–0,5 клк, температуре 10–12 °С и протоке фильтрованной черноморской воды около 1 л·ч⁻¹.

За две недели до начала эксперимента водоросли в аквариуме перебрали и промыли, через него запустили со скоростью 0,5 л·ч⁻¹ проток питательной среды на основе фильтрованной черноморской воды с солёностью 17,5‰, на каждый литр которой добавляли 8,5 г поваренной соли; 43,5 мг KNO₃; 6,15 мг KH₂PO₄·3H₂O; 5,76 мг FeSO₄·7H₂O, предварительно проваренного в дистилляте совместно с 15 мг EDTA-Na₂; 2,47 мг MnCl₂·4H₂O; 1,03 г MgSO₄·7H₂O (так, чтобы суммарная солёность не превышала 27,5‰). Для подращивания гелидиума использовали те же два культиватора размером 0,3×0,3×0,5 м (площадью 0,09 м², объёмом 45 л), что и при разработке известного способа [16].

В культиватор № 1 (К-1) из секции 1 аквариума (рис. 1) загрузили 180 г гелидиума, а в культиватор № 2 (К-2) — 225 г из его секции 3. Температуру среды, прошедшей через фильтр (Ф), в аквариуме поддерживали с помощью терморегулятора Тр-1 на уровне $(10 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а освещённость в дневное время — на уровне не более 0,5 клк. Заполнив культиваторы № 1 и 2 приготовленной питательной средой, установили её проток через К-1 — $2 \text{ л}\cdot\text{ч}^{-1}$ ($1,07 \text{ об}\cdot\text{сут}^{-1}$) — и через К-2 — $3 \text{ л}\cdot\text{ч}^{-1}$ ($1,6 \text{ об}\cdot\text{сут}^{-1}$), увеличивая ежедневно на $0,2 \text{ л}\cdot\text{ч}^{-1}$. Температуру питательной среды на входе в культиваторы в течение первых 36 ч первого цикла с помощью терморегулятора ТР-2 поддерживали на уровне $(19 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а последующие пять суток — на уровне $16\text{--}17^\circ\text{C}$. Освещённость на поверхности воды в культиваторах — $(20 \pm 0,3)$ клк. Значения рН среды поддерживали на уровне 7,9–8,2 подачей углекислоты из расчёта 25–30 г на 1 кг водорослей в сутки: в К-1 — $4,6 \text{ г}\cdot\text{сут}^{-1}$, а в К-2 — $6,7 \text{ г}\cdot\text{сут}^{-1}$. Культиваторы барботировали сжатым воздухом для создания объёмного вращения питательной среды вместе с талломами водорослей.

Через семь суток сырую биомассу гелидиума взвесили и, промыв, вернули в секции 1 и 3 аквариума, а в очищенные культиваторы загрузили 180 и 225 г гелидиума из секций 2 и 4. Культивирование проводили при тех же условиях освещённости, температуры и питания, что и в первом цикле. По окончании второго цикла гелидиум взвесили, промыли и вернули в секции 2 и 4 аквариума. Для запуска третьего цикла освободили секции 1 и 3, отобрали, соответственно, 180 и 225 г наиболее чистых и здоровых талломов и загрузили в культиваторы 1 и 2, а приросты биомасс использовали в качестве урожая, определив в них содержание АСВ и общее количество

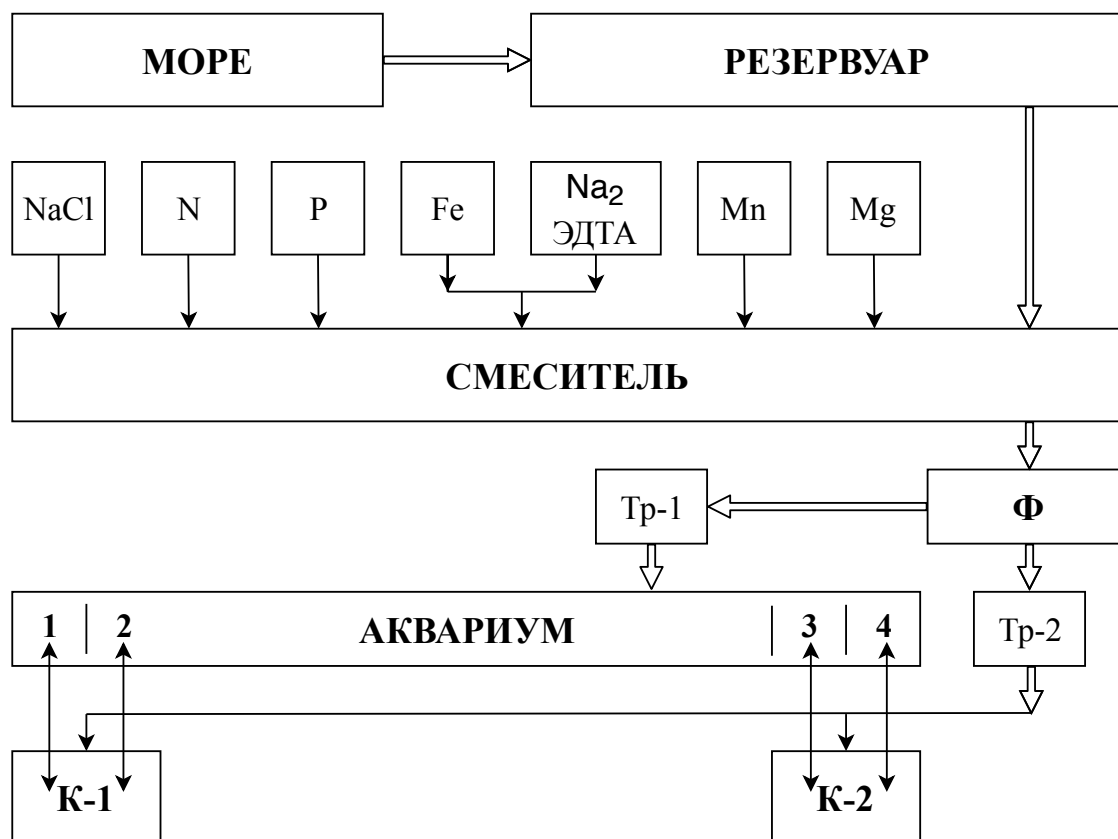


Рис. 1. Схема выращивания черноморского гелидиума для получения R-фикоэритрина. К-1, К-2 — культиваторы; Ф — фильтр; Тр-1, Тр-2 — терморегуляторы

Fig. 1. Scheme of growing of Black Sea gelidium for obtaining R-phycoerythrin. К-1, К-2 – cultivators; Ф – filter; Тр-1, Тр-2 – thermoregulators

R-фикоэритрина. Среднюю температуру питательной среды в культиваторах повышали каждые два цикла на 1 °С. В каждом культиваторе провели по восемь циклов. Результаты представлены в табл. 1, где:

- ΔW_n , г — приращение (урожай) сырой биомассы гелидиума за неделю;
- μ — удельная скорость весового роста;
- % АСВ — процент абсолютно сухого вещества в пробе;
- R-фэ, мг·г⁻¹ АСВ — содержание R-фикоэритрина на грамм абсолютно сухого вещества;
- R-фэ, мг — общее количество R-фикоэритрина в приросте.

Таблица 1. Прирост биомассы гелидиума и концентрация R-фикоэритрина в течение восьми недель эксперимента

Table 1. Growth of gelidium biological mass and concentration of R-phycoerythrin during eight weeks of the experiment

№ цикла	Культиватор № 1					Культиватор № 2				
	ΔW_n , г	μ	% АСВ	R-фэ, мг·г ⁻¹ АСВ	R-фэ, мг	ΔW_n , г	μ	% АСВ	R-фэ, мг·г ⁻¹ АСВ	R-фэ, мг
1	23,0	0,017	40,4	12,8	119,0	27,8	0,017	39,6	13,8	151,9
2	25,4	0,019	39,1	12,0	119,1	29,7	0,018	38,7	14,4	148,3
3	49,7	0,035	38,5	13,3	254,5	54,1	0,031	37,9	12,9	264,5
4	50,4	0,035	38,0	14,7	281,5	58,3	0,033	38,1	14,0	311,0
5	68,7	0,046	37,0	13,9	357,1	83,2	0,045	38,5	13,7	438,8
6	77,6	0,051	37,9	14,4	423,5	88,3	0,047	37,9	13,2	441,7
7	79,5	0,052	36,1	15,1	433,4	94,1	0,050	36,5	12,7	436,2
8	76,2	0,050	37,2	16,2	459,2	93,7	0,050	37,0	13,1	454,2
Σ	440,5				2447,3	529,2				2646,6

Суммарный урожай (прирост) сырой массы гелидиума для культиватора № 1 за восемь недель составил 440,5 г (87,4 г·м⁻²·сут⁻¹), а для культиватора № 2 — 529,2 г (105,0 г·м⁻²·сут⁻¹) (в среднем — (96,2 ± 8,8) г·м⁻²·сут⁻¹). Этот результат вполне сопоставим с результатом наращивания биомассы по известному способу [16] на аналогичном оборудовании (461,5 г и 520,0 г). Между тем по количеству получаемого R-фикоэритрина методы отличаются весьма существенно — (14,1 ± 2,1) мг·г⁻¹ АСВ для К-1 и (13,55 ± 0,85) мг·г⁻¹ АСВ для К-2 против (6,7 ± 1,0) мг·г⁻¹ АСВ [7].

Таким образом, если взять минимальный урожай сырой массы гелидиума 87,4 г·м⁻²·сут⁻¹, то при минимальном содержании сухого вещества 36 % и при содержании в нём фикоэритрина до 12 мг·г⁻¹ система культиваторов с глубиной не менее 0,5 м и общей площадью зеркальной поверхности 1 га обеспечит урожай не менее 1100 кг чистого R-фикоэритрина при работе не более 300 дней в году.

Заключение. Принципиальное отличие предлагаемой технологии культивирования гелидиума как источника R-фикоэритрина от других методик заключается в изменении состава питательной среды, а именно в замене хлорного железа сернокислым и в добавлении солей марганца и магния при повышении её солёности поваренной солью для подавления эпифитов.

Прогрессивным и значительно упрощающим технологию оказался метод подачи в культиваторы питательной среды, скорость протока которой при постоянной концентрации биогенов повышают пропорционально увеличению культивируемой биомассы. Всё это вместе с осуществлением постоянного слабого протока питательной среды через аквариум, где водоросли находятся в режиме «отдыха» при пониженной температуре и освещённости, способствовало увеличению накопления R-фикоэритрина в талломах гелидиума более чем в 2 раза по сравнению с результатом, достигаемым при применении известной ранее технологии.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Агар в Севастополе* [Электронный ресурс]. URL: <https://sevastopol.tiu.ru/Agar.html> [дата обращения 31.03.2018]. [*Agar v Sevastopole* [Electronic resource]. URL: <https://sevastopol.tiu.ru/Agar.html> [accessed 31.03.2018]. (in Russ.)]
2. Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. *Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий*. Москва : Наука, 1976. 280 с. [Adler Yu. P., Markova E. V., Granovskiy Yu. V. *Planirovanie eksperimenta pri poiske optimalnykh uslovii*. Moscow: Nauka, 1976, 280 p. (in Russ.)]
3. Беляев Б. Н. Техническое обеспечение культивирования макрофитов // *Рыбное хозяйство Украины*. 2001. № 5. С. 21–24. [Belyaev B. N. Tehnicheskoe obespechenie kultivirovaniya makrofitov. *Rybnoe khozyaistvo Ukrainy*, 2001, no. 5, pp. 21–24. (in Russ.)]
4. Беляев Б. Н., Береговая Н. М., Далекая Л. Б. Влияние солености на продуктивность красной черноморской водоросли *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. // *Рыбное хозяйство Украины*. 2005. № 6 (41). С. 12–17. [Belyaev B. N., Beregovaya N. M., Dalekaya L. B. Vliyanie solenosti na produktivnost' krasnoi chernomorskoj vodorosli *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. *Rybnoe khozyaistvo Ukrainy*, 2005, № 6 (41), pp. 12–17. (in Russ.)]
5. Беляев Б. Н. Скорость потребления биогенов при культивировании *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) // *Альгология*. 2008. Т. 18, № 3. С. 256–263. [Belyaev B. N. Consumption of biogen rate by cultivation of *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta). *Algologiya*, 2008, vol. 18, no. 3, pp. 256–263. (in Russ.)]
6. Беляев Б. Н. Перспективы интенсивного культивирования черноморской красной водоросли *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) // *Рыбное хозяйство Украины*. 2009. № 4. С. 13–18. [Belyaev B. N. Perspektivy intensivnogo kul'tivirovaniya chernomorskoj krasnoi vodorosli *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta). *Rybnoe khozyaistvo Ukrainy*, 2009, no. 4, pp. 13–18. (in Russ.)]
7. Беляев Б. Н., Береговая Н. М. Оптимизация условий культивирования для накопления Р-фикоэритрина, суммарных каротиноидов и хлорофилла *a* в талломах гелидиума *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) // *Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона* : материалы VII Междунар. конф., Керчь, 20–22 июня 2012 г. Керчь : ЮгНИРО, 2012. Т. 2. С. 120–124. [Belyaev B. N., Beregovaya N. M. Optimization of culture conditions for accumulation of R-phycoerythrin, total lipochromes and chlorophyll *a* in thallomes of helidium *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta). In: *Sovremennye rybokhozyaistvennye i ekologicheskie problemy Azovo-Chernomorskogo regiona* : materialy VII Mezhdunar. konf., Kerch, 20–22 June, 2012. Kerch: YugNIRO, 2012, vol. 2, pp. 120–124. (in Russ.)]
8. Беляев Б. Н., Береговая Н. М. Влияние состава культуральной среды на количество агара, пигментов и рост черноморского гелидиума *Gelidium spinosum* // *Морской биологический журнал*, 2016. Т. 1, № 4. С. 3–11. [Belyaev B. N., Beregovaya N. M. The influence of culture medium on the quantity of agar, pigments and growth of *Gelidium spinosum* from the Black Sea. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2016, vol. 1, no. 4, pp. 3–11. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2016.01.4.01>
9. Беляев Б. Н., Береговая Н. М. Влияние микродобавок Mn, Co, Zn на рост и биохимический состав черноморского гелидиума // *Морские биологические исследования: достижения и перспективы* : в 3-х т. : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, приуроч. к 145-летию Севастопольской биологической станции, Севастополь, 19–24 сент. 2016 г. / под общ. ред. А. В. Гаевской. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 3. С. 346–348. [Belyaev B. N., Beregovaya N. M. Influence of microaddings Mn, Co, Zn on a height and biochemical composition of Black Sea gelidium. In: *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy* : v 3-kh t. : sb. materialov Vseros. nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem, priuroch. k 145-letiyu

- Sevastopol'skoi biologicheskoi stantsii, Sevastopol, 19–24 Sept., 2016 / A. V. Gaevskaya (Ed.). Sevastopol: EKOSI-Gidrofisika, 2016, vol. 3, pp. 346–348. (in Russ.)]
10. Декл. пат. UA №42208 А, МКИ 7 С12N1/12, А01G 33/00. Спосіб вирощування чорноморської червоної водорості *Laurencia papillosa* (Forsk) Grev. / Беляев Б. М., Євстїгнеєва І. К. ; заявник Інститут біології південних морів ім. А. О. Ковалевського НАН України (UA). №20001116443 ; заявл. 14.11.00 ; друк. 15.10.01. Бюл. №9. [Dekl. pat. UA №42208 А, МКУ 7 С12N1/12, А01G 33/00. Sposib vyroshchuvannya chornomorskoї chervonoї vodorosti *Laurencia papillosa* (Forsk) Grev. / Beliaiev B. M., Yevstihneieva I. K.; zaiavnyk Instytut byolohii pivdennykh moriv im. A. O. Kovalevskoho NAN Ukrainy (UA). No. 20001116443; zaiavl. 14.11.00; druk. 15.10.01. Biul. №9. (in Ukr.)]
 11. Дзизюров В. Д., Жильцова Л. В. Возможности сопряжения функций роста и накопления в ней гелеобразующих полисахаридов у двух видов агарофитов – *Ahnfeltia tobuchinsis* и *Gracilaria lichenides* // III Всесоюзная конференция по морской биологии : тез. докл., Севастополь, октябрь 1988 г. Киев, 1988. Ч. 2. С. 202–203. [Dzizyurov V. D., Zhil'tsova L. V. Vozmozhnosti sopryazheniya funktsii rosta i nakopleniya v nei geleobrazuyushchikh polisakharidov u dvukh vidov agarofitov – *Ahnfeltia tobuchinsis* i *Gracilaria lichenides*. In: III Vsesoyuznaya konferentsiya po morskoi biologii : tez. dokl., Sevastopol, October 1988. Kiev, 1988, pt. 2, pp. 202–203. (in Russ.)]
 12. Заявка 94063376. Україна, МКИ 6 С 12N 1/12. Спосіб культивування чорноморської червоної водорості *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. / Беляев Б. Н., Силкин В. А. (Україна); ИнБЮМ НАНУ (Україна). № В – 4602186 ; заявлено 15.06.94 ; друк. 29.08.97. Пром. власн. оф. бюл. № 4. [Zayavka 94063376. Ukraine, MKI 6 C 12N 1/12. Sposib kultyvuvannya chornomors'koi chervonnoi vodorosti *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. / Belyaev B. N., Silkin V. A. (Ukraine), InBYuM NANU (Ukraine). No. B – 4602186; zayavleno 15.06.94; druk. 29.08.97. Prom. vlasn. of. byul. no. 4. (in Ukr.)]
 13. Калугина А. А., Грюнер В. С., Соколова Н. Н. Агар из черноморской водоросли гелидиум // *Рыбное хозяйство*. 1964. №4. С. 68–70. [Kalugina A. A., Gryuner V. S., Sokolova N. N. Agar iz chernomorskoї vodorosli gelidium. *Rybnoe khozyaistvo*, 1964, no. 4, pp. 68–70. (in Russ.)]
 14. Красновский А. А. Выделение фикоэритрина из красных водорослей, его спектральные и фотохимические свойства // *Доклады Академии наук СССР*, 1952. Т. 82, №6. С. 947–950. [Krasnovskii A. A. Vydelenie fikoeritrina iz krasnykh vodoroslei, ego spektral'nye i fotokhimicheskie svoistva. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 1952, vol. 82, no. 6, pp. 947–950. (in Russ.)]
 15. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // *Морской экологический журнал*. 2008. Т. 7, №2. С. 5–23. [Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N. Unicellular algae as renewable biological resource: A review. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2008, vol. 7, no. 2, pp. 5–23. (in Russ.)]
 16. Пат. UA 96379 С2, МПК А01G 33/00. Спосіб культивування чорноморської водорості *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) / Беляев Б. Н. (UA) ; заявник Інститут біології південних морів ім. А. О. Ковалевського НАН України (UA). № а 201008755 ; заявл. 13.07.2010 ; друк. 25.10.2011. Бюл. № 20. [Pat. UA 96379 S2, МПК А01G 33/00. Sposib kultyvuvannya chornomorskoї vodorosti *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta) / Beliaev B. N. (UA); zaiavnyk Instytut byolohii pivdennykh moriv im. A. O. Kovalevskoho NAN Ukrainy (UA). № а 201008755; zaiavl. 13.07.2010; druk. 25.10.2011. Biul. № 20. (in Ukr.)]
 17. Стадничук И. Н. *Фиколипиды*. Москва : ВИНТИ, 1990. 196 с. (Итоги науки и техники. Сер. Биологическая химия). [Stadnichuk I. N. *Fikobiliproteiny*. Moscow: VINITI, 1990, 196 p. (Itogi nauki i tekhniki. Ser. Biologicheskaya khimiya). (in Russ.)]
 18. Huguenin J. E. En examination of problems and potentials for future large scale intensive seaweed culture systems. *Aquaculture*, 1976, no. 9, pp. 313–342. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90074-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90074-0)
 19. Kaliaperumal N., Rao M. U. Studies on the standing crop and phycocolloid of *Gelidium pusillum* and *Pterocladia heteroplatos*. *Indian Journal of Botany*, 1981, vol. 4, no. 2, pp. 91–95.
 20. Huang L. Preliminary observations on the growth of *Gelidium amansii* Lamx. in the sporelings stage. *Acta Oceanologica Sinica*, 1982, vol. 4, no. 2, pp. 223–230.

**NEW TECHNOLOGY OF BLACK SEA ALGAE
GELIDIUM SPINOSUM (S. G. GMELIN) P. C. SILVA (RHODOPHYTA) CULTIVATION****B. N. Belyaev, N. M. Beregovaya**

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: belyaevbob@yandex.ru

The results of long-term studies of conditions of cultivation of red Black Sea algae *Gelidium spinosum* (S. G. Gmelin) P. C. Silva (Rhodophyta) in Silva P. C., Basson P. W. & Moe R. L. 1996: 141 in the systems of engineering type aimed at increasing R-phycoerythrin concentration are given. The systems were developed on the basis of studying the influence of temperature, light and regimes of the nutrient medium flow saturated with carbon dioxide on the biomass growth and were protected by several patents. Anti-fouling methods were also taken into consideration while developing the systems. The relevance of the work is determined by the value of *G. spinosum*, which is a natural pigment and food dye, a powerful antioxidant used in immune diagnosis, microscopy and cytometry, the cost of which is estimated at \$3250–14000 per 1 gram. The aim of the work was to optimize Black Sea *G. spinosum* cultivation conditions in the coastal systems of engineering type for increasing the yield of the R-phycoerythrin per unit of the area of cultivators. As the material we used *G. spinosum* from fouling of the rocks and shore protection structures in the vicinity of Sevastopol, which was cultivated in the laboratory setup at the temperature in the range of 15–27 °C, light intensity 10–25 klx in the regime of 18 h day : 6 h night, variations of flow of the nutrient medium using the Black Sea water with addition of salt, salts of nitrogen, phosphorus, iron, magnesium and manganese. At the last stage of the work the yield was $(96.2 \pm 8.8) \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ of *G. spinosum* wet weight. At the lowest harvest of $87.4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$, with a minimum of dry matter of 36 % and the content of phycoerythrin to $12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, the pigment yield of R-phycoerythrin will be $378.6 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$. In the future, the coastal system of the cultivators with the depth of 0.5 m and mirror surface area of 1 ha (when working only 300 days a year) will produce not less than 1100 kg of R-phycoerythrin.

Keywords: macrophytes, gelidium, cultivation, R-phycoerythrin, struggle with epiphytes, composition and mobility of the nutrient medium, temperature, illumination