

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2463>
<https://elibrary.ru/NKFQYF>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Оптимизация получения полисахаридов из *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200



С. А. Сухих*, Е. А. Буденкова, Ю.-Д. С. Бойченко,
В. Д. Анохова, В. Ф. Долганюк, Е. В. Каширских

Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

Поступила в редакцию: 25.07.2023

Принята после рецензирования: 23.08.2023

Принята к публикации: 05.09.2023

*С. А. Сухих: stas-asp@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>

Е. А. Буденкова: <https://orcid.org/0000-0003-4854-5459>

В. Ф. Долганюк: <https://orcid.org/0000-0003-0603-7456>

Е. В. Каширских: <https://orcid.org/0000-0003-0442-5471>

© С. А. Сухих, Е. А. Буденкова, Ю.-Д. С. Бойченко,
В. Д. Анохова, В. Ф. Долганюк, Е. В. Каширских, 2023



Аннотация.

Цианобактерии являются перспективными продуцентами экзополисахаридов, обладающих высокой биологической активностью. Актуальным является вопрос выделения и идентификации экзополисахаридов из штамма цианобактерий *Cyanobacterium* sp. рода *Cyanobacterium* семейства *Cyanobacteriaceae* fam. nov. Цель исследования заключалась в изучении экзополисахаридов штамма цианобактерий *Cyanobacterium* sp. B-1200, в зависимости от физико-химических условий культивирования и состава культуральной среды, и подборе оптимальных параметров экстракции и очистки экзополисахаридов из культуральной среды.

Штамм цианобактерий *Cyanobacterium* sp. B-1200 выращивали в условиях освещения 7500 ± 50 люкс (12 ч света/12 ч темноты). Сухую клеточную массу цианобактерий определяли методом гравиметрии, а также с использованием градуировочного графика зависимости количества биомассы от степени поглощения при длине волны 750 нм. Количество полисахаридов в культуральной жидкости оценивали антрон-серноокислым методом. Экстракцию полисахаридов осуществляли путем спиртового осаждения. Метод ультразвукового диспергирования применяли для деструкции клеточных стенок цианобактерий.

В результате исследования подобрали оптимальные параметры экстракции и очистки экзополисахаридов. Удаление из культуральной среды гидрокарбоната натрия и увеличение его концентрации в среде на 300 % положительно влияло на выход полисахаридов. Оптимальным значением активной кислотности для синтеза полисахаридов являлось значение $\text{pH} = 6$. Оптимальная температура для накопления полисахаридов – 35°C , хотя наибольшее количество биомассы отмечено при 25°C . Интенсивное белое освещение способствовало наибольшему выходу экзополисахаридов в культуральную среду, красно-белое освещение вызывало изменение морфологии клеток цианобактерий. При проведении экстракции влияние оказывали концентрация, температура и природа экстрагента: наибольший выход экзополисахаридов наблюдался при использовании изопропанола, наименьший – при использовании бутанола.

В результате подбора оптимальных режимов экстракции и очистки полисахаридов были сформулированы следующие рекомендации: для ультразвуковой обработки рекомендовано использовать мощность 20 Вт и время обработки 5 мин, для сублимационной – продолжительность 8 ч и температура -15°C .

Ключевые слова. *Cyanobacterium* sp., экзополисахариды, спиртовая экстракция, условия культивирования, ультразвуковое диспергирование, культуральная жидкость, нейтральные сахара, уроновые кислоты

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России), проект № 075-15-2022-245 (внутр. 13.2251.21.0134).

Для цитирования: Оптимизация получения полисахаридов из *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 / С. А. Сухих [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 3. С. 630–641. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2463>

Optimizing the Production of Polysaccharides from *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200



Stanislav A. Sukhikh*, Ekaterina A. Budenkova, Yulia-Danae S. Boychenko, Veronika D. Anokhova, Vyacheslav F. Dolganyuk, Egor V. Kashirskih

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 25.07.2023
Revised: 23.08.2023
Accepted: 05.09.2023

*Stanislav A. Sukhikh: stas-asp@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>
Ekaterina A. Budenkova: <https://orcid.org/0000-0003-4854-5459>
Vyacheslav F. Dolganyuk: <https://orcid.org/0000-0003-0603-7456>
Egor V. Kashirskih: <https://orcid.org/0000-0003-0442-5471>

© S.A. Sukhikh, E.A. Budenkova, Yu.-D.S. Boychenko, V.D. Anokhova, V.F. Dolganyuk, E.V. Kashirskih, 2023



Abstract.

Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200 is a cyanobacteria strain that belongs to the rare genus *Cyanobacterium*, family *Cyanobacteriaceae* fam. nov. Studies devoted to the isolation of secondary metabolites from this strain concentrate mostly on the fatty acid composition while the issue of isolating and identifying exopolysaccharides remains understudied. However, polysaccharides from cyanobacteria are of scientific and economic interest in the framework of biotechnology, medicine, pharmacology, etc. The research objective was to study the effect of the physicochemical conditions of cultivation and the composition of the cultural medium on exopolysaccharide production.

Cyanobacterium sp. B-1200 were grown under 7500 ± 50 lux (12 h light/12 h dark). The dry cell weight was determined by gravimetry and a calibration plot that illustrated the dependence of the biomass amount on the degree of absorption at a wavelength of 750 nm. The amount of polysaccharides in the culture liquid was assessed by the Anthrone-sulphate method. The extraction was carried out by alcohol precipitation. The method of ultrasonic dispersion was used to destroy the cell walls of cyanobacteria.

The experimental study revealed the optimal parameters for the extraction and purification of exopolysaccharides from the culture medium. Removal of sodium bicarbonate from the medium and a 300%-increase in its concentration raised the yield of polysaccharides. The optimal value of active acidity for the synthesis of polysaccharides was pH = 6 while the optimal temperature for their accumulation was 35°C. The largest amount of biomass was obtained at 25°C. Intense white illumination contributed to the greatest release of exopolysaccharides into the culture medium; red-white illumination affected the morphology of cyanobacteria cells. During the extraction, the concentration, temperature, and nature of the extractant proved to be the most important factors. For example, isopropanol produced the highest yield while butanol triggered the least effective response.

The optimal extraction and purification modes for polysaccharides were as follows. For ultrasonic processing, the best results were obtained at a power of 20 W after 5 min. For freeze drying, the rational parameters were 8 h at –15°C.

Keywords. *Cyanobacterium* sp., exopolysaccharides, alcohol extraction, cultivation conditions, ultrasonic dispersion, culture liquid, neutral sugars, uronic acids

Funding. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauki), project no. 075-15-2022-245 (ext. 13.2251.21.0134).

For citation: Sukhikh SA, Budenkova EA, Boychenko Yu-DS, Anokhova VD, Dolganyuk VF, Kashirskih EV. Optimizing the Production of Polysaccharides from *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(3):630–641. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2463>

Введение

Полисахариды представляют собой биополимеры, встречающиеся в природе в ряде организмов, таких как животные, растения, грибы и бактерии.

Экзополисахариды – полимеры с большой молекулярной массой, которые выделяются клетками организмов в окружающую среду и состоят из остатков сахаров [1]. Экзополисахариды привлекают

внимание исследователей из-за своей биологической активности и применения в фармацевтической и диагностической индустриях [2].

Микроводоросли и цианобактерии являются перспективными продуцентами экзополисахаридов, по сравнению с микроорганизмами, поскольку для их культивирования не требуются богатые углеводами субстраты. Определенные условия культивирования позволяют добиться увеличения продукции экзополисахаридов: стрессовые физические факторы (температура, освещение), солевой стресс и др. [3]. Интерес вызывают экзополисахариды цианобактерий, поскольку их наличие обуславливает присутствие цианобактерий даже в экстремальных условиях и их легкую адаптацию к этим средам. Экзополисахариды способствуют образованию биопленок, которые являются одним из эффективных способов выживания в суровых условиях окружающей среды [4].

Экзополисахариды цианобактерий обладают сложной химической структурой, которая обуславливает их биологически активный потенциал [5]. Они характеризуются большим разнообразием как по количеству конститутивных моносахаридов (от 2 до 10), так и по их типу (различное расположение кислых и нейтральных сахаров). Большинство экзополисахаридов цианобактерий имеет анионную природу из-за присутствия уроновых кислот и/или других заряженных групп, таких как пирувил или сульфат. Иногда обнаруживаются полипептидные фрагменты и ацетильные заместители [6]. Функции экзополисахаридов различаются у разных видов и обеспечивают в качестве основного механизма выживания в экстремальных условиях защиту от токсинов, тяжелых металлов, условий окружающей среды и дефицита питательных факторов. Они модифицируют текучесть внешней среды и участвуют в важных для структурирования сообщества биопленок клеточных коммуникациях. Таким образом, выживание и рост цианобактерий зависят от свойств и наличия экзополисахаридов. В связи с этим на производство экзополисахаридов цианобактерии расходуют до 70 % всего запаса энергии [7].

Экзополисахариды цианобактерий находят применение в различных отраслях промышленности, таких как медицина, косметология и др. [8]. Полисахариды цианобактерий обладают ранозаживляющими и противоаллергическими свойствами, поэтому их можно рассматривать как сырье для производства гипоаллергенной ранозаживляющей косметики [9]. Такой цианобактериальный полисахарид, как сакран, имеет потенциал применения в тканевой инженерии, фармакологии и в производстве биомедицинских материалов [10]. Также экзополисахариды цианобактерий рассматриваются как сырье для производства биосмазочных материалов [11].

Несмотря на биотехнологический потенциал экзополисахаридов, не все виды микроводорослей и

цианобактерий имеют естественно высокую концентрацию. Это обуславливает необходимость подбора физико-химических параметров культивирования. Многими исследованиями показано, что варьирование технологических параметров культивирования способствует адаптации метаболизма микроводорослей для производства большего количества полисахаридов [12–15]. Например, при изменении температурного и светового режимов, ограничении макро- и микроэлементного состава (в основном азота) и солевого стресса. Таким образом, оптимизация технологических условий культивирования микроводорослей способствует увеличению скорости роста клеток, производства биомассы и выхода полисахаридов.

Исследование J. B. Moreira и др. подтверждает, что снижение концентрации питательных веществ в культуральной среде способствует увеличению выработки экзополисахаридов микроводорослями [16]. Повышение концентрации питательных веществ в культуральной среде, как и снижение, может привести к аналогичному результату. В случае с цианобактерией *Cyanobacterium* sp. высокие концентрации гидрокарбоната натрия способствовали увеличению содержания полисахаридов до 49,2 % [17].

Штамм *Cyanobacterium* sp. B-1200 относится к немногочисленному и поли/парафилетическому роду *Cyanobacterium*, семейству *Cyanobacteriaceae* fam. nov. и порядку *Chroococcales* или Хлорококковые [18]. Этот штамм цианобактерий был выделен и очищен из соленого озера Балхаш, Казахстан. Штамм характеризуется относительно высоким содержанием жирных кислот (миристиновой и миристоеиновой), их количество может достигать 60 % [19]. Однако отсутствуют сведения о содержании и составе полисахаридов для этого штамма.

Целью работы являлось исследование продукции экзополисахаридов из штамма цианобактерии *Cyanobacterium* sp. B-1200, в зависимости от физико-химических условий культивирования и состава культуральной среды, а также подбор оптимальных параметров экстракции и очистки экзополисахаридов из культуральной среды.

Объекты и методы исследования

Штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. B-1200 был приобретен из Коллекции 143 микроводорослей и цианобактерий Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук (ИППАС ИПП РАН). Клетки одиночные или парные, с продольно расположенным тилакоидами, без слизистых оболочек (рис. 1). Штамм охарактеризован как алкалофил, мезофил, светолюбивый и автотроф; выделен в 2012 г. из озера Балхаш, Казахстан [19].

Методом периодического культивирования штамм *Cyanobacterium* sp. B-1200 выращивали в конических колбах объемом 100 мл при освещении 7500 ± 50 люкс

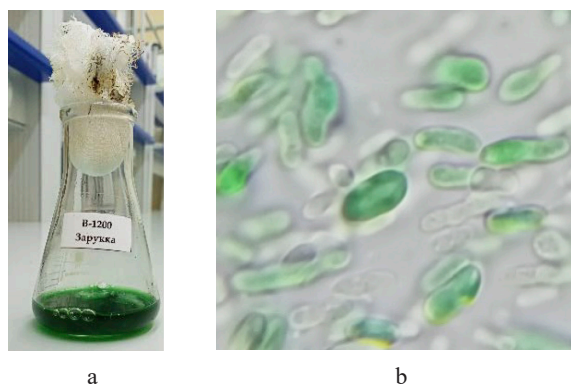


Рисунок 1. Морфология штамма *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – макровид, б – клетки при 100-кратном увеличении

Figure 1. Morphology of *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – macro view, б – cells at 100× magnification

(12 ч света/12 ч темноты). Освещение обеспечивалось светодиодной лампой ProLine 580 LED (Spectrum Brands, Inc., Мелле, Германия) с белыми и красными светодиодами (8:1). Уровень интенсивности оценивали люксметром. Для культивирования *Cyanobacterium* sp. B-1200 использовали питательную среду Заррука, которую готовили в соответствии с протоколом [20]. Длительность культивирования составила 12 суток.

Определение сухой клеточной массы цианобактерий проводили гравиметрическим методом, а также с использованием градуировочного графика зависимости количества биомассы от степени поглощения при длине волны 750 нм.

Для гравиметрического анализа из пробы отбирали аликвоту в объеме 1 мл, которую взвешивали с точностью до четвертого знака после запятой. Пробирку с отобраным содержимым центрифугировали при 3900 об/мин в течение 1 мин, затем отбрасывали супернатант. К осадку приливали 1 мл дистиллированной воды, вортиксовали 1 мин и заново центрифугировали. Процедуру повторяли 1–2 раза. Полученный промытый осадок (клетки микроводорослей) высушивали в сушильном шкафу при 45 °C в течение ночи. После высушивания пробирку переносили в охлажденный штатив и взвешивали с точностью до четвертого знака после запятой. Массу клеток определяли по формуле (1):

$$m = (m_1 - m_0) \times 1000 \quad (1)$$

где m – сухая масса микроводорослей, г/л; m_1 – масса пробирки и сухих микроводорослей, г; m_0 – масса пустой пробирки, г; 1000 – коэффициент пересчета массы в г/л из г/мл.

Калибровочная кривая зависимости количества биомассы от степени поглощения при 750 нм была

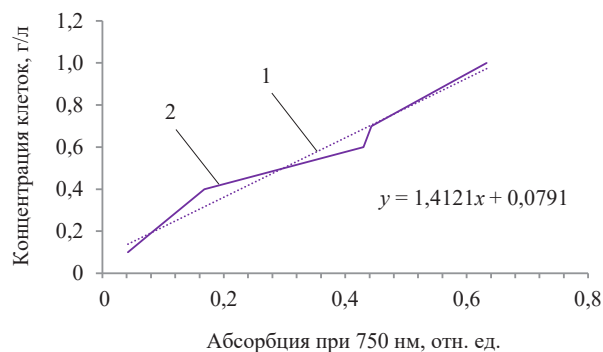


Рисунок 2. Калибровочная кривая зависимости уровня абсорбции суспензии (1) и сухой биомассы (2) штамма *Cyanobacterium* sp. B-1200

Figure 2. Effect of absorption in the suspension (1) on dry biomass (2) of the *Cyanobacterium* sp. strain B-1200, calibration curve

получена путем последовательного разведения концентрированной суспензии культуры (рис. 2). Переход культуры в экспоненциальную фазу (log) роста и завершение этой фазы определяли путем взятия логарифма всех значений поглощения и мониторинга в зависимости от времени культивирования. Удельную скорость роста (μ) культуры, количество клеточных делений в сутки и время удвоения биомассы (T_d) микроводорослей рассчитывали с использованием формул, предложенных М. J. Griffiths и др. [21]. Удельный темп роста культуры (μ) высчитывали по формуле (2):

$$\mu = \frac{m_1 - m_0}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

где m_1 – масса культуры микроводорослей в определенный момент роста, мг/г суточной массы; m_0 – начальная масса, мг/г суточной массы; t_1 – время отбора проб в определенный момент времени, сутки; t_0 – начало роста культуры. Время удвоения биомассы (T_d) высчитывали по формуле 3:

$$T_d = (t_2 - t_1) \times \frac{\log(2)}{\log(q_2 / q_1)} \quad (3)$$

где t_1 – время начала культивирования; t_2 – время отбора проб; q_2 – масса культуры микроводорослей в определенной точке роста, мг/г массы тела; q_1 – начальная масса, мг/г массы тела.

Количество полисахаридов в культуральной жидкости изучали спектрофотометрическим методом на спектрофотометре SolidSpec-3700/3700 DUV (Shimadzu, Киото, Япония). Для этого производили отбор проб в объеме 1 мл, предварительно размешав суспензию до гомогенного состояния. От данного объема переносили в лунки 96-луночного планшета 150 мкл образца и немедленно проводили анализ, чтобы избежать оседания клеток. Контролем для из-

мерения концентрации клеток в суспензии служила соответствующая стерильная питательная среда. Измерение проводили при длине волны 750 нм для всех микроводорослей, т. к. при данной длине волны возможность интерференции по абсорбции хлорофилла минимальна. Оставшийся объем аликвоты центрифугировали при 3900 об/мин 5 мин. Надосадочную жидкость анализировали на общее содержание свободных углеводов и экзополисахаридов антрон-сернокислым методом.

Для определения уруновых кислот перед проведением реакции с карбазолом необходимо провести демеоксилирование, т. к. неодинаковая степень демеоксилирования затрудняет получение достоверных результатов. Демеоксилирование проводили при комнатной температуре. Для этого к 0,5 мл раствора фракции с концентрацией 0,5 мг/мл приливали 2 мл 0,05 Н NaOH и через полчаса 0,2 мл 0,05 Н HCl. Затем в пробирки добавляли по 0,5 мл демеоксилированной суспензии микроводорослей, помещали в сосуд со льдом и по каплям приливали 3 мл раствора бората в серной кислоте. Пробирки с анализируемой пробой встряхивали в охлажденной смеси и после завершения реакции нагревали 6 мин на кипящей водяной бане. После кипячения пробирки снова охлаждали в сосуде с водой и льдом. В две пробирки с экстрактом фракции микроводорослей и одну с водой добавляли 0,1 мл 0,2 % раствора карбазола в абсолютном этаноле, затем их вновь помещали в кипящую водяную баню на 10 мин. Препарат карбазола перекристаллизован из бензола и очищен возгонкой. По разнице пошедшего на реакцию карбазола определяли количество уруновых кислот.

Количество нейтральных сахаров определяли согласно методике [22]. Для этого исследуемый образец в объеме 50 мкл смешивали с антроновым реактивом в соотношении 1:3. Суспензию доводили до гомогенного состояния и нагревали до 70 °С в течение 5 мин. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры и измеряли уровень абсорбции при 620 нм на планшетном ридере на спектрофотометре SolidSpec-3700/3700 DUV (Shimadzu, Киото, Япония). Контролем служила соответствующая питательная среда. Полученные значения абсорбции конвертировали в массовые значения (г/л) с помощью калибровочной кривой. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации была получена с использованием разведенных растворов стандартного образца сахарозы.

В качестве водонерастворимого спирта для двухфазной экстракции экзополисахаридов использовали бутанол. Образцы культуральной среды с клетками микроводорослей центрифугировали при 3900 об/мин в течение 20 мин в центрифуге 1701 Hettich ROTINA 380 (DV-expert, Москва, Россия), собирали надосадочную жидкость и фильтровали через бумажный фильтр с размером пор 2–3 мкм (Millab,

Москва, Россия). Фильтрат смешивали с различными спиртами (этанол, бутанол, изопропанол) в соотношениях 1:1, 1:2, 1:3 и оставляли на 12 ч при различных температурах (от –30 до +30 °С с шагом 10 °С). После осаждения растворы центрифугировали при 3900 об/мин в центрифуге, надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок высушивали в лиофильной сушилке Inei-6 (Институт биологического приборостроения Российской академии наук, Пушкино, Россия) в течение 12 ч при –20 °С и давлении 0,350 мбар. После сушки выход выделенных полисахаридов определяли гравиметрически. Затем выделенную массу полисахарида пересчитывали на сухую биомассу (мг/г сухой биомассы) по формуле (4):

$$m = \frac{m_{\text{od480}}}{m_{\text{d.w.}}} \quad (4)$$

Для разрушения клеточных стенок использовали метод ультразвукового диспергирования. Осадок культуральной жидкости растворяли в дистиллированной воде и подбирали параметры ультразвукового диспергирования в ультразвуковой установке УП200Ст (АнтиС, Санкт-Петербург, Россия) с различной мощностью (20, 40 и 60 Вт) и продолжительностью обработки (0,5, 1, 2, 3 и 4 мин) [23]. Затем массу полисахаридов пересчитывали антрон-сульфатным методом на сухую биомассу (мг/г с.в.) по формуле (1).

Каждый эксперимент проводили в трехкратной повторности, а данные представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Полученные данные обрабатывали стандартными статистическими методами. Данные подвергали дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием пакета Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2007, США). Апостериорный анализ (критерий Дункана) проводился для выявления образцов, отличающихся друг от друга. Равенство дисперсий извлеченных выборок проверяли с помощью теста Левена. Различия между средними значениями считались значимыми, если доверительный интервал был меньше 5 % ($p < 0,05$). Построение графиков проводили с помощью пакета Excel (Microsoft Corporation, 15,0, 2016, Редмонд, Вашингтон, США).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования была проведена оптимизация состава питательных сред с целью максимального накопления полисахаридов клетками *Cyanobacterium* sp. В-1200. Ограничение поступления питательных веществ является широко используемой стратегией для увеличения накопления полисахаридов микроводорослями [12–15, 22].

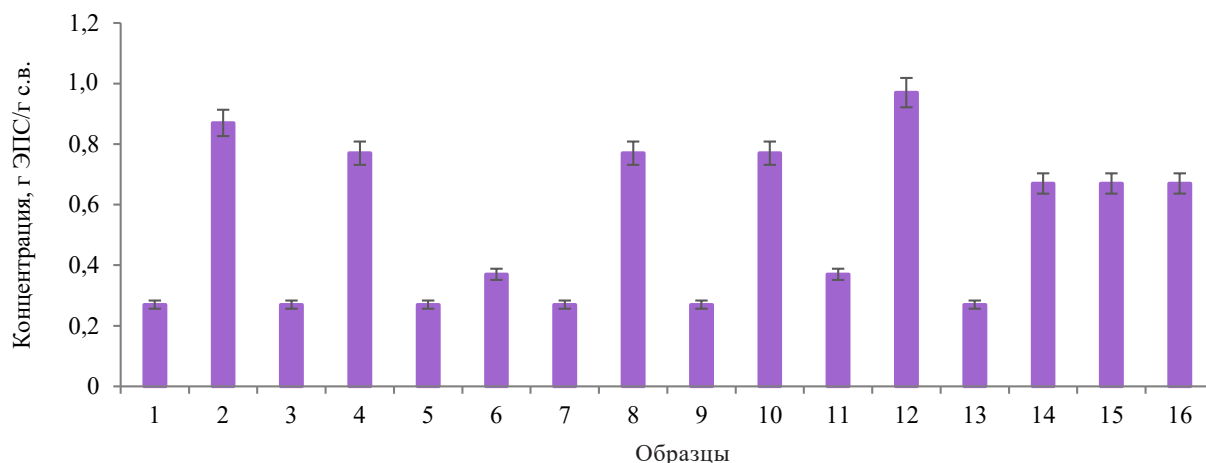
В качестве факторов, которые варьировали в процессе оптимизации питательной среды, были выбраны соли NaNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 и NaCl . Остальные компоненты присутствовали в стандарт-

ной концентрации. Наибольший выход полисахаридов был зафиксирован при удалении из среды гидрокарбоната натрия: в этом случае концентрация экзополисахаридов (ЭПС) составила 0,97 г ЭПС/г с.в. (рис. 3).

Провели исследование по определению такой концентрации солей, при которой продукция экзополисахаридов была бы максимальной. Для этого варьировали концентрации компонентов среды, которые были приняты в качестве исследуемых факторов

(NaNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 и NaCl). При варьировании использовали исходную концентрацию (0 %), а также увеличенные на 200, 250 и 300 % от исходной (рис. 4).

Эмпирические данные на рисунке 4 показывают, что при увеличении в среде нитрата натрия на 300 %, по сравнению с исходной концентрацией (2,5 г/л), наблюдается максимальный выход экзополисахаридов – 4 г ЭПС/г с.в. Оптимальной концентрацией фосфата калия является исходное значение (1,0 г/л).



Факторы	Образцы															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
X_1	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
X_2	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+
X_3	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
X_4	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+

X_1 – NaNO_3 , X_2 – $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, X_3 – NaHCO_3 , X_4 – NaCl ; «–» – нижний уровень фактора, «+» – верхний уровень фактора.

Рисунок 3. Влияние состава питательной среды на выработку экзополисахаридов штаммом *Cyanobacterium* sp. B-1200

Figure 3. Effect of nutrient medium composition on the production of exopolysaccharides by *Cyanobacterium* sp. B-1200

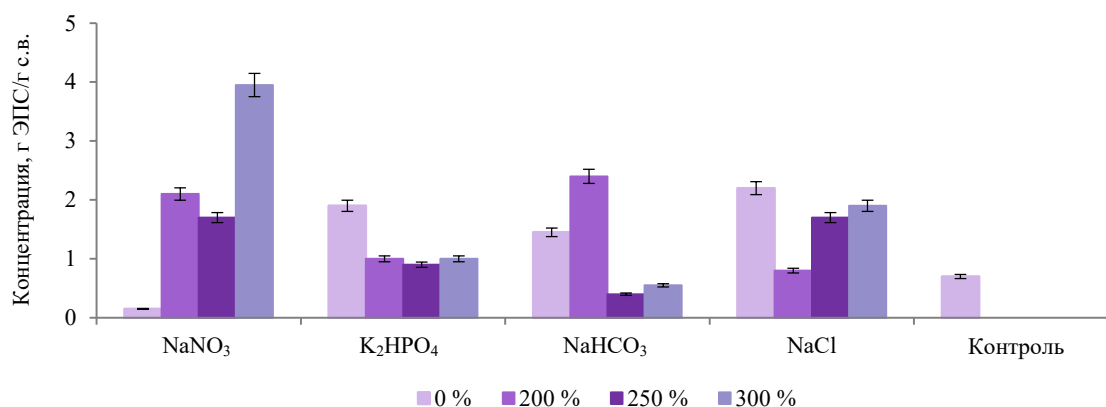
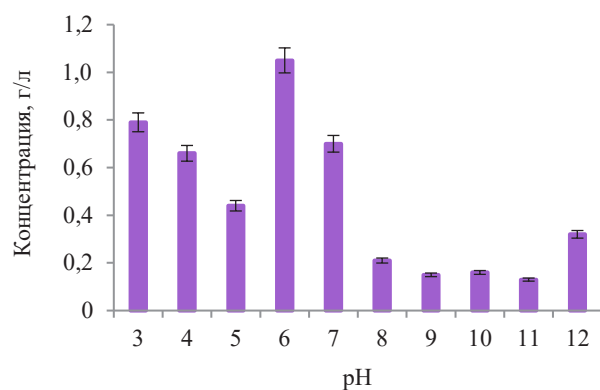
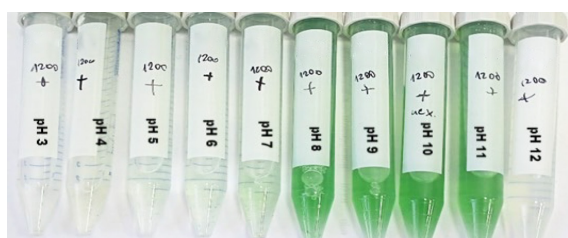


Рисунок 4. Влияние варьирования состава питательной среды на выработку экзополисахаридов штаммом *Cyanobacterium* sp. B-1200

Figure 4. Effect of various nutrient media on the production of exopolysaccharides by *Cyanobacterium* sp. B-1200



a



b

Рисунок 5. Влияние исходного значения pH на морфологию и продукцию экзополисахаридов штаммом *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – концентрация экзополисахаридов; б – внешний вид культуральной жидкости

Figure 5. Effect of initial pH on morphology and exopolysaccharide production from *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – concentration of exopolysaccharides; б – culture liquid

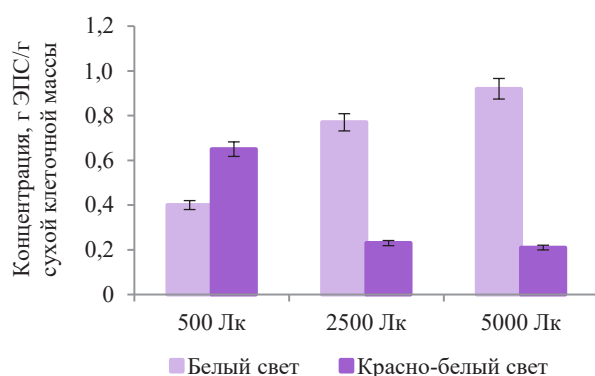


Рисунок 7. Продукция экзополисахаридов и морфология клеток в условиях различного освещения для штамма *Cyanobacterium* sp. B-1200

Figure 7. Exopolysaccharide production and cell morphology under different lighting conditions for *Cyanobacterium* sp. B-1200

При увеличении концентрации карбоната натрия (200 % от исходной) наблюдается повышение концентрации экзополисахаридов почти до 2,5 ЭПС/г с.в., что выше исходного уровня этой соли (16,8 г/л).

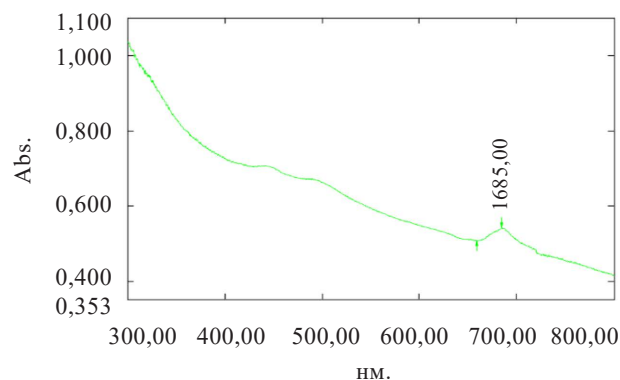


Рисунок 6. Оптический спектр поглощения света суспензией *Cyanobacterium* sp. B-1200

Figure 6. Optical spectrum of light absorption by *Cyanobacterium* sp. B-1200

В случае с хлоридом натрия оптимальной концентрацией этого компонента является исходное значение – 1 г/л. При данной концентрации выход полисахаридов составил примерно 2,1 г ЭПС/г с.в. (рис. 4).

Провели варьирование активной кислотности (значение pH) от 3,0 до 12,0 ед. в процессе культивирования с целью определения продуктивности накопления биомассы и полисахаридов микроводорослей и цианобактерий. Диапазон исследуемых значений активной кислотности выбран согласно аналогичным исследованиям [24]. Применяли водные растворы 1 М гидроксида натрия и 1 М соляной кислоты для регулировки значений pH (рис. 5).

Значения pH > 7 действуют угнетающе на продукцию полисахаридов (рис. 5а). Максимальный выход полисахаридов отмечен при значении pH 6 и составляет 1,05 г/л. При значении pH 3 выход полисахаридов составил 0,79 г/л. При значениях pH 8–11 визуально наблюдали увеличение концентрации клеток (рис. 5б).

Подбор освещения осуществляли в соответствии с полученным спектром поглощения света суспензией цианобактерий (рис. 6). Пигментный состав данного штамма представлен хлорофиллом а, пик которого соответствует значению длины волны 680 нм, а отклики в диапазоне 400–550 нм могут соответствовать каротиноидам [25].

В ходе эксперимента выявлено, что свет влияет на синтез экзополисахаридов. Результаты эмпирических данных (рис. 7) подтверждают, что при интенсивном белом освещении (5000 Лк) наблюдается максимальный выход экзополисахаридов в культуральную жидкость у штамма цианобактерий *Cyanobacterium* sp. B-1200 – 0,92 г ЭПС/г сухой клеточной массы. Также наблюдается линейное снижение выхода полисахаридов при снижении интенсивности белого освещения: при освещении интенсивностью 500 Лк выход полисахаридов составил

0,41 г ЭПС/г сухой клеточной массы. При красно-белом освещении наблюдается обратная зависимость: при максимальном освещении (5000 Лк) наблюдается самый низкий выход экзополисахаридов – 0,22 г ЭПС/г сухой клеточной массы. Однако при снижении интенсивности красно-белого освещения наблюдается увеличение выхода экзополисахаридов, которое составило 0,65 г ЭПС/г сухой клеточной массы (рис. 7).

Отметили изменение морфологии клеток в разных условиях: при освещении красно-белой лампы культура клеток теряет характерное изумрудное окрашивание (рис. 8a) в сравнении с белым освещением (рис. 8b).

Штамм *Cyanobacterium* sp. B-1200 продуцировал максимальное количество биомассы при температуре 25 °С. Концентрация клеток в культуральной жидкости при культивировании этих штаммов составила 0,59 г/л. Однако максимальное количество полисахаридов (2 г/л) получено при температуре окружающей среды 35 °С (рис. 9).

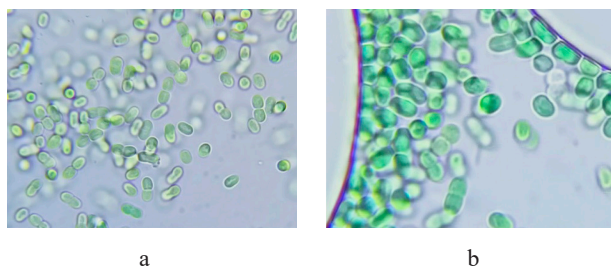
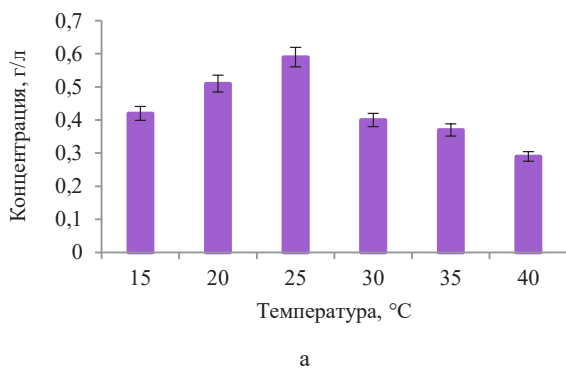


Рисунок 8. Морфология клеток в условиях различного освещения для штамма *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – красно-белое освещение; б – белое освещение; 100× иммерсия

Figure 8. Cell morphology under different lighting conditions for *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – red and white lighting; б – white lighting; ×100 immersion



При экстракции экзополисахаридов из культуральной жидкости микроводоросли *Cyanobacterium* sp. B-1200 96 % этиловым спиртом при модуле экстракции 1:3 и температуре 5 °С наблюдался наибольший для данного экстрагента выход экзополисахаридов – 1323,08 мг/г. Наименьший выход экзополисахаридов при модуле 1:1 и температуре 25 °С составил 107,69 мг/г. При использовании в качестве экстрагента 99 % изопропилового спирта, модуля экстракции 1:3 и температуры 5 °С выделение экзополисахаридов из микроводоросли *Cyanobacterium* sp. B-1200 было максимальным – 4030,77 мг/г, минимальный выход экзополисахаридов (423,08 мг/г) наблюдали при модуле экстракции 1:1 и температуре 25 °С. Экстракция экзополисахаридов проводилась изопропиловым спиртом. Наиболее однородные результаты по выходу экзополисахаридов показала экстракция 99 % изопропиловым спиртом при модуле экстракции 1:2 и различных температурах: для –25 °С – 2423,08 мг/г, для –15 °С – 2415,38 мг/г, для 5 °С – 2661,54 мг/г, для 15 °С – 2476,92 мг/г, для 25 °С – 2446,15 мг/г. При использовании в качестве экстрагента 99 % бутилового спирта при модуле экстракции 1:1 и температуре 5 °С наблюдался наибольший для данного модуля экстракции выход экзополисахаридов из микроводоросли *Cyanobacterium* sp. B-1200 – 246,15 мг/г, при модуле экстракции 1:2 и температуре 25 °С наибольший выход экзополисахаридов составил 492,31 мг/г. Экстракция 99 % бутиловым спиртом при модуле экстракции 1:3 и температуре 15 °С привела к выделению из культуральной жидкости микроводоросли *Cyanobacterium* sp. B-1200 592,31 мг/г экзополисахаридов (рис. 10).

Рассматривали метод ультразвуковой обработки культуральной жидкости с последующим спиртовым осаждением экзополисахаридов по выбранным оптимальным условиям. Ультразвуковая экстракция – это эффективный метод экстракции различных типов полисахаридов. Акустическая кавитация

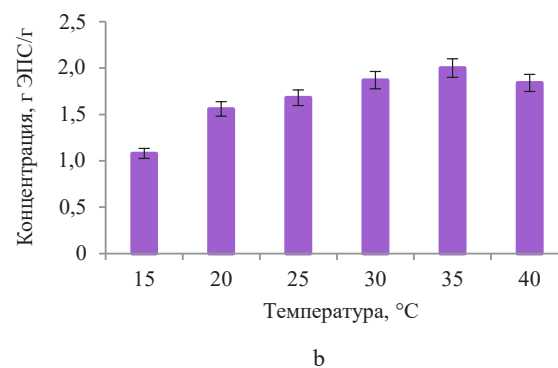


Рисунок 9. Выход полисахаридов *Cyanobacterium* sp. B-1200 при варьировании температуры: а – биомасса; б – экзополисахариды

Figure 9. Effect of temperature on polysaccharide yield from *Cyanobacterium* sp. B-1200: а – biomass; б – exopolysaccharides

в методе ультразвуковой экстракции может разрушать клеточные стенки, уменьшать размеры частиц и улучшать контакт между растворителями и целевыми соединениями [26]. Поскольку ультразвуковая экстракция характеризуется более низким энергопотреблением, меньшим потреблением растворителей, более высокой эффективностью экстракции и более высоким уровнем автоматизации, то этот способ экстракции полисахаридов предпочтительнее, чем экстракция химическими растворителями [27]. Рабочие параметры, включая мощность и частоту ультразвука, продолжительность экстракции и температуру, влияют на выходы экстракции полисахаридов [28].

Наибольший выход полисахаридов наблюдается в результате ультразвуковой обработки мощностью 20 Вт в течение 5 мин и составляет 107,56 мг/г сухой

массы. Однако мощность ультразвуковой обработки 20 Вт также дает высокий выход полисахаридов, независимо от времени обработки (рис. 11).

С целью обезвоживания полисахаридов, выделенных из образцов микроводорослей и цианобактерий, методом лиофилизации (сублимации) для каждого образца индивидуально подбирали температурный режим (в диапазоне -15 до -35 °C) и продолжительность процесса сублимации (общую длительность цикла сушки варьировали в пределах 8–24 ч). Общую длительность процесса и продолжительность этапа сублимации фиксировали по изменению температуры в слое концентрата полисахаридов. Наибольший выход экзополисахаридов наблюдался при продолжительности сублимационной сушки 8 ч и температуре сушки -15 °C. Максимальный выход эндополисахаридов зафиксировали

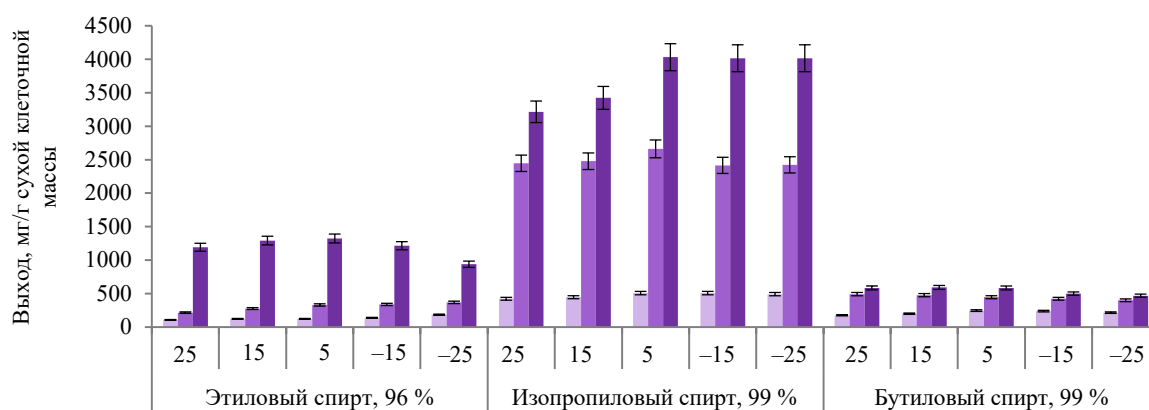


Рисунок 10. Подбор параметров экстракции экзополисахаридов из культуральной жидкости *Cyanobacterium* sp. B-1200: 1 – модуль экстракции (образец:спирт) 1:1; 2 – модуль экстракции 1:2; 3 – модуль экстракции 1:3

Figure 10. Parameters for exopolysaccharides extraction from *Cyanobacterium* sp. B-1200: 1 – extraction module (sample:alcohol) 1:1; 2 – extraction module 1:2; 3 – extraction module 1:3

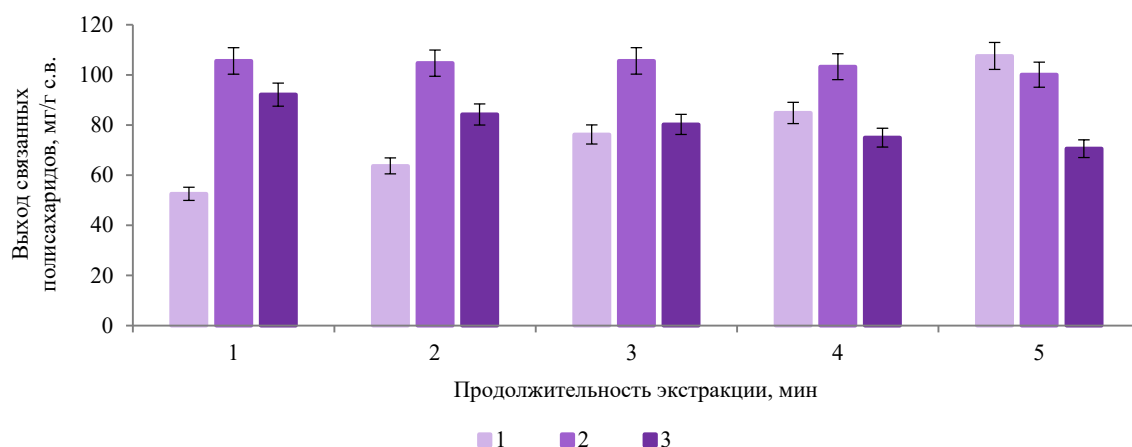


Рисунок 11. Выход связанных полисахаридов *Cyanobacterium* sp. B-1200 в зависимости от мощности обработки ультразвуком: 1 – 20 Вт; 2 – 40 Вт; 3 – 60 Вт

Figure 11. Yield of bound polysaccharides from *Cyanobacterium* sp. B-1200 depending on ultrasonic power: 1 – 20 W; 2 – 40 W; 3 – 60 W

Таблица 1. Выход полисахаридов, выделенных из *Cyanobacterium* sp. B-1200, в зависимости от продолжительности и температуры сушки

Table 1. Effect of drying time and temperature on polysaccharide yield from *Cyanobacterium* sp. B-1200

Продолжительность сушки, ч	Экзополисахариды			Эндополисахариды		
	Температура сушки, °С					
	–15	–25	–35	–15	–25	–35
8	9,2 ± 0,3 ^{a/a}	6,4 ± 0,1 ^{a/a}	7,2 ± 0,2 ^{a/a}	6,8 ± 0,2 ^{a/a}	6,1 ± 0,2 ^{a/a}	5,7 ± 0,1 ^{a/a}
12	8,7 ± 0,2 ^{a/a}	5,9 ± 0,1 ^{ab/a}	7,1 ± 0,2 ^{a/a}	6,3 ± 0,1 ^{a/a}	5,6 ± 0,1 ^{a/a}	5,8 ± 0,2 ^{a/a}
16	8,7 ± 0,2 ^{a/a}	5,1 ± 0,1 ^{b/a}	7,1 ± 0,2 ^{a/a}	5,4 ± 0,1 ^{a/a}	4,9 ± 0,1 ^{a/a}	4,4 ± 0,2 ^{a/a}
24	8,7 ± 0,2 ^{a/a}	5,1 ± 0,1 ^{ab/a}	7,1 ± 0,2 ^{a/a}	5,6 ± 0,2 ^{a/a}	5,1 ± 0,2 ^{a/a}	4,8 ± 0,1 ^{a/a}

Значения в столбцах/строках, за которыми следует одна и та же буква, достоверно не отличаются ($p > 0,05$). Оценено с помощью post-hoc теста (критерий Дункана).

Values in columns/rows marked by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$): a post-hoc Duncan test.

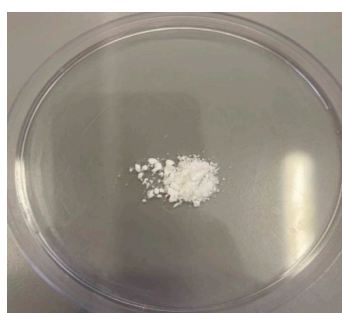


Рисунок 12. Образец полисахаридов из *Cyanobacterium* sp. B-1200, высушенный методом сублимации

Figure 12. Freeze-dried polysaccharides from *Cyanobacterium* sp. B-1200

в аналогичных условиях сушки (табл. 1). Внешний вид полисахаридов представлен на рисунке 12.

Содержание уоновых кислот в микроводорослях и цианобактериях изучали в связи с тем, что в состав полисахаридов микроводорослей входят не растворимые в воде кислые полисахариды (полиурониды), состоящие из уоновых кислот. Именно они проявляют биологически активные свойства. Нейтральные сахара – важнейший класс соединений, входящих в водорастворимые полисахариды микроводорослей и цианобактерий, который, наравне с кислыми сахарами (уроновыми кислотами), отвечает за биологически активные свойства полисахаридов и определяет эффективность их использования в различных областях науки и техники.

Концентрация нейтральных сахаров в культуральной жидкости составила 0,751 мг/г, содержание уоновых кислот – 0,163 мг/г.

Выводы

Были подобраны рациональные условия культивирования и экстракции штамма цианобактерии *Cyanobacterium* sp. B-1200 для максимизации выхода

полисахаридов как ценных биологически активных соединений. Наибольший выход полисахаридов зафиксировали при удалении из среды гидрокарбоната натрия. При увеличении концентрации этого компонента на 300 %, по сравнению с исходной концентрацией, наблюдалась интенсификация синтеза экзополисахаридов. Значения $pH > 7$ действовали угнетающе на продукцию полисахаридов; оптимальное значение $pH = 6$. Температура также влияла на выход биомассы и полисахаридов: максимальное количество биомассы наблюдалось при температуре 25 °С; максимальное количество полисахаридов – при температуре окружающей среды 35 °С, что может являться адаптацией клеток к высокой температуре. В ходе эксперимента выявлено, что свет также влиял на синтез экзополисахаридов: при интенсивном освещении белым светом (5000 Лк) наблюдался максимальный выход экзополисахаридов в культуральную жидкость. Показано изменение морфологии клеток при красно-белом освещении. Установлено, что влияние оказывают концентрация и температура экстрагента при спиртовой экстракции. Среди выбранных спиртов наибольший выход экзополисахаридов наблюдался при использовании изопропанола, наименьший – при использовании бутанола. При экстракции изопропанолом наибольший выход экзополисахаридов происходил при температуре осадка –15 и –25 °С. Для ультразвуковой обработки рекомендовано использовать мощность 20 Вт и время обработки 5 мин, для сублимационной сушки – продолжительность 8 ч и температура –15 °С.

Критерии авторства

Фактический вклад каждого автора: С. А. Сухих – 20 %, Е. А. Буденкова – 25 %, Ю.-Д. С. Бойченко – 15 %, В. Д. Анохова – 15 %, В. Ф. Долганюк – 10 %, Е. В. Каширских – 15 %.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

S.A. Sukhikh – 20%, E.A. Budenkova – 25%,
Yu.-D.S. Boychenko – 15%, V.D. Anokhova – 15%,
V.F. Dolganyuk – 10%, E.V. Kashirskikh – 15%.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. El-Ghonemy DH. Antioxidant and antimicrobial activities of exopolysaccharides produced by a novel *Aspergillus* sp. DHE6 under optimized submerged fermentation conditions. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2021;36. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102150>
2. Ramos J, Villacrés NA, Cavaleiro ÉTG, Alarcón HA, Valderrama AC. Preparation of sodium alginate films incorporated with hydroalcoholic extract of *Macrocystis pyrifera* L. Foods and Raw Materials. 2023;11(1):64–71. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-553>
3. Moreira JB, Kuntzler SG, Bezerra PQM, Aguiar Cassuriaga AP, Zaparoli M, da Silva JLV, et al. Recent advances of microalgae exopolysaccharides for application as bioflocculants. Polysaccharides. 2022;3(1):264–276. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010015>
4. Potnis AA, Raghavan PS, Rajaram H. Overview on cyanobacterial exopolysaccharides and biofilms: Role in bio-remediation. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2021;20:781–794. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09586-w>
5. Zuniga EG, Boateng KKA, Bui NU, Kurnfuli S, Muthana SM, Risser DD. Identification of a hormogonium polysaccharide-specific gene set conserved in filamentous cyanobacteria. Molecular Microbiology. 2020;114(4):597–608. <https://doi.org/10.1111/mmi.14566>
6. de Philippis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from Cyanobacteria and their possible applications. FEMS Microbiology Reviews. 1998;22(3):151–175. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00365.x>
7. Bhatnagar M, Bhatnagar A. Diversity of polysaccharides in cyanobacteria. In: Satyanarayana T, Johri BN, Das SK, editors. Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications. Volume 1. Microbial diversity in normal & extreme environments. Singapore: Springer; 2019. pp. 447–496. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_15
8. Morone J, Alfeus A, Vasconcelos V, Martins R. Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals – A new bioactive approach. Algal Research. 2019;41. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>
9. Tseng C-C, Yeh H-Y, Liao Z-H, Hung S-W, Chen B, Lee P-T, et al. An *in vitro* study shows the potential of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) polysaccharides extract for wound-healing and anti-allergic use in the cosmetics industry. Journal of Functional Foods. 2021;87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104754>
10. Okeyoshi K, Okajima MK, Kaneko T. The cyanobacterial polysaccharide sacran: Characteristics, structures, and preparation of LC gels. Polymer Journal. 2021;53:81–91. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00426-2>
11. Borah D, Gopalakrishnan S, Nooruddin T. Carbohydrate biolubricants from algae and cyanobacteria. Journal of Polymers and the Environment. 2021;29:3444–3458. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02144-z>
12. Kumar D, Kvidrová J, Kaštánek P, Lukavský J. The green alga *Dictyosphaerium chlorelloides* biomass and polysaccharides production determined using cultivation in crossed gradients of temperature and light. Engineering in Life Sciences. 2017;17:1030–1038. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700014>
13. Moreno J, Angeles Vargas M, Olivares H, Rivas J, Guerrero MG. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. Journal of Biotechnology. 1998;60(3):175–182. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00003-0)
14. Singh SP, Singh P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015;50:431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
15. Zhao T, Han X, Cao H. Effect of temperature on biological macromolecules of three microalgae and application of FT-IR for evaluating microalgal lipid characterization. ACS omega. 2020;5(51):33262–33268. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04961>
16. Moreira JB, da Silva Vaz B, Cardias BB, Cruz CG, de Almeida ACA, Costa JAV, et al. Microalgae polysaccharides: An alternative source for food production and sustainable agriculture. Polysaccharides. 2022;3(2):441–457. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3020027>
17. Chen Z, Li T, Yang B, Jin X, Wu H, Wu J, et al. Isolation of a novel strain of *Cyanobacterium* sp. with good adaptation to extreme alkalinity and high polysaccharide yield. Journal of Oceanology and Limnology. 2021;39:1131–1142. <https://doi.org/10.1007/s00343-020-0113-7>
18. Komárek J, Kaštovský J, Mareš J, Johansen JR. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia. 2014;86:295–335.

19. Sarsekeyeva FK, Usserbaeva AA, Zayadan BK, Mironov KS, Sidorov RA, Kozlova AYU, *et al.* Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition. *Advances in Microbiology*. 2014;4(15):1033–1043. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.415114>
20. Zarrouk, C. Contribution a l'étude d'une cyanobacterie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner) Geitler. France: University of Paris; 1966. (In French).
21. Griffiths MJ, Garcin C, van Hille RP, Harrison STL. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;85(2):119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>
22. Babich O, Budenkova E, Kashirskikh E, Dolganyuk V, Ivanova S, Prosekov A, *et al.* Study of the polysaccharide production by the microalga *Vischeria punctate* in relation to cultivation conditions. *Life*. 2022;12(10). <https://doi.org/10.3390/life12101614>
23. Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao L, Grewell D, Wang T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*. 2012;125:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.110>
24. Yang D, Yang H. The temperature dependent extraction of polysaccharides from *eucheuma* and the rheological synergistic effect in their mixtures with kappa carrageenan. *LWT*. 2020;129. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109515>
25. Chernyshev DN, Klochkova VS, Lelekov AS. Separation of the absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. in the red area. *Issues of Modern Algology*. 2022;28(1):25–34. (In Russ.). [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-25-34](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-25-34)
26. Zhang D-Y, Wan Y, Xu J-Y, Wu G-H, Li L, Yao X-H. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*. 2016;137:473–479. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.016>
27. Ying Z, Han X, Li J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*. 2011;127(3):1273–1279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.083>
28. Cui F-J, Qian L-S, Sun W-J, Zhang J-S, Yang Y, Li N, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Volvariella volvacea*: Process optimization and structural characterization. *Molecules*. 2018;23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071706>
29. Mishra A, Jha B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*. 2009;100(13):3382–3386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.006>
30. Markou G, Chatzipavlidis I, Georgakakis D. Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Improvements through phosphorus limitation process. *BioEnergy Research*. 2012;5:915–925. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9205-3>
31. Costa JAV, Lucas BF, Alvarenga AGP, Moreira JB, de Moraes MG. Microalgae polysaccharides: an overview of production, characterization, and potential applications. *Polysaccharides*. 2021;2(4):759–772. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040046>
32. Wu Y, Cui SW, Tang J, Gu X. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited *sterculia* seeds by response surface methodology. *Food Chemistry*. 2007;105(4):1599–1605. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.066>
33. Chaouch MA, Hafsa J, Rihouey C, Le Cerf D, Majdoub H. Effect of pH during extraction on the antioxidant and antiglycated activities of polysaccharides from *Opuntia Ficus indica*. *Journal of Food Biochemistry*. 2016;40(3):316–325. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12220>
34. Lu J, You L, Lin Z, Zhao M, Cui C. The antioxidant capacity of polysaccharide from *Laminaria japonica* by citric acid extraction. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013;48(7):1352–1358. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12072>
35. Ye J, Hua X, Wang M, Zhang W, Yang R. Effect of extraction pH on the yield and physicochemical properties of polysaccharides extracts from peanut sediment of aqueous extraction process. *LWT*. 2019;106:137–144. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.049>
36. Taghavijeloudar M, Kebria DY, Yaqoubnejad P. Simultaneous harvesting and extracellular polymeric substances extrusion of microalgae using surfactant: Promoting surfactant-assisted flocculation through pH adjustment. *Bioresource Technology*. 2021;319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124224>
37. Xing P, Hahnke RL, Unfried F, Markert S, Huang S, Barbeyron T, *et al.* Niches of two polysaccharide-degrading *Polaribacter* isolates from the North Sea during a spring diatom bloom. *ISME Journal*. 2015;9:1410–1422. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.225>