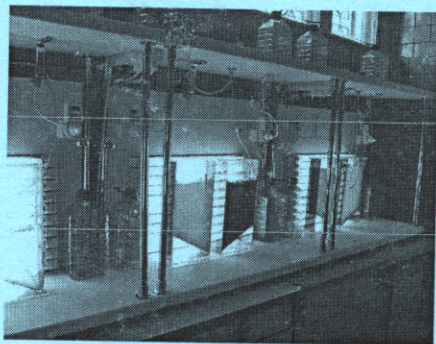


57.082
M 66

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А.О. КОВАЛЕВСКОГО

Р. П. Тренкеншу, А. Б. Боровков,
А. С. Лелеков

**УНИФИЦИРОВАННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ УСТАНОВКА
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НИЗШИХ ФОТОТРОФОВ**



Севастополь – 2009

УДК 57.082

Тренкеншу Р. П., Боровков А. Б., Лелеков А. С.

Унифицированная лабораторная установка для исследования низших фототрофов – Севастополь: ОЦ НАНУ, 2009. – 40 с. – (Препринт)

В работе приводится описание лабораторной установки для исследования ростовых, биохимических и физиологических характеристик низших фототрофов, обоснование её конструкции, сравнение с традиционными способами культивирования. Также предлагается использовать её как унифицированную конструкцию при организации работ с микроводорослями в НИИ и ВУЗах.

Монография представляет интерес для специалистов-биотехнологов и преподавателей-биологов. Также будет полезна аспирантам соответствующих специальностей и студентам высших учебных заведений.

Института биологии южных
2 от 17.02.09.

Боровков А. Б., Лелеков А. С., 2009
09

Введение.

Существует два способа культивирования клеток: накопительный (периодический) и непрерывный. В случае накопительного способа выращивания в освещаемый культиватор, заполненный питательной средой, содержащей необходимые для роста биогенные элементы, вносится небольшое количество клеток микроводорослей (инокулят). Рост микроводорослей приводит со временем к увеличению концентрации клеток до некоторой максимальной плотности культуры. Эта плотность ограничена либо элементами минерального питания, либо интенсивностью света, либо накоплением метаболитов, либо другими физико-химическими условиями среды. Графически такой рост изображается S-образной кривой, форма которой зависит от условий, в которых выращиваются клетки, и кинетических характеристик культуры микроводорослей [3, 5, 12, 13, 16].

Совсем иная картина будет наблюдаться при вмешательстве экспериментатора в процессы роста в любой фазе развития периодической культуры, например, при разбавлении культуры питательной средой. Картина роста будет зависеть от величины этого разбавления и используемой среды. При определенных условиях (неизменность биохимического состава, возрастной структуры популяции клеток, концентрации метаболитов и др.) динамика роста после разбавления будет повторять прежнюю [16]. Процедуру разбавления можно повторять неоднократно, в результате чего в культиваторе будет наблюдаться непрерывный рост культуры. Подбирая относительные объемы и моменты разбавления можно управлять процессами роста микроводорослей. Разбавление культуры представляет собой основу управления ростом микроводорослей. Причем управление ростом в культуре может осуществляться только по плотности культуры и времени, что следует из определения кинетических характеристик роста. Действительно, выбирая относительный объем разбавления можно уменьшать плотность культуры до необходимой величины, а, изменяя промежуток времени между разбавлениями, можно повышать плотность до необходимой за счет роста культуры. Ясно, что регулирование имеет пределы, оп-

ределяемые внешними условиями и предельными видоспецифическими характеристиками роста микроводорослей.

В данной работе предлагается установка, которая обеспечивает рост культуры низших фототрофов как в накопительном режиме, так и в режиме хемотрата при требуемых удельных скоростях потока. Установка может быть использована при организации лабораторных работ по изучению роста микроводорослей на биологических факультетах университетов, а также в качестве экспериментальных культиваторов при организации промышленного производства. Использование установки в научно-исследовательских институтах позволит получить новые знания о росте микроводорослей, причем результаты, полученные разными авторами для разных видов микроводорослей, будут сопоставимы благодаря одинаковым условиям роста культур.

Актуальность.

Использование микроводорослей в научно-исследовательских и промышленных целях непрерывно расширяется. Различные виды водорослей служат источниками растительного белка, витаминов, хлорофилл-каротиноидных комплексов и т. д. Микроводоросли, в качестве объекта марикультуры, представляются перспективными объектами, прежде всего, как эффективные преобразователи световой энергии и как источники трофического назначения. Использование микроводорослей для доочистки сточных вод позволяет решить проблему возрастающей эвтрофикации поверхностных водоёмов [1, 6, 11, 14, 15].

В связи с изложенными аспектами возникает вопрос о способах культивирования микроводорослей. Разработке систем культивирования микроводорослей посвящено немало литературы [2, 5, 12]. Авторы предлагают разные виды конструкций, начиная от самых элементарных лабораторных культиваторов, заканчивая автоматизированными промышленными системами [23, 26, 28, 29]. Реально в научно-исследовательских учреждениях в качестве лабораторных культиваторов традиционно используется химическая посуда. При этом, как правило, процедура измерения поверхностной радиации практически не учитывает расхождение форм освещаемых поверхностей. При перемешивании сус-

пензии барботированием воздухом или газовоздушной смесью довольно приблизительно указывается количество воздуха на единицу объема перемешиваемой суспензии. Указанные обстоятельства не дают возможности корректного сравнения экспериментальных данных, например, для расчета кинетических характеристик роста микроводорослей.

Таким образом, создание унифицированной установки для культивирования микроводорослей позволит получить новые знания о процессах роста и накопления биохимических компонентов клетками микроводорослей.

Требования к установке.

Установка для культивирования микроводорослей должна удовлетворять следующим требованиям:

1. Все составные элементы системы разработаны на основе теоретических представлений о кинетике роста микроводорослей [8, 16, 17]. Например, геометрия фотобиореактора должна быть такой, чтобы легко и довольно точно можно было рассчитывать важнейшие характеристики системы (фазы роста, объем, площадь освещаемой поверхности, интенсивность поверхностной радиации и др.).
2. Все составные системы культивирования должны быть стандартного фабричного производства, чтобы в случае выхода из строя какого-нибудь элемента конструкции его замена не представляла бы трудностей.
3. Простота и надежность конструкции.
4. Контроль над основными параметрами процесса и возможность простого управления ими.
5. Минимальная стоимость всей системы культивирования.

Цель – на основе разработанной кинетической теории роста микроводорослей создать унифицированную систему культивирования, как некоторый стандарт, для использования в лабораторной практике студентов, преподавателей и научных сотрудников.

Теоретическое обоснование конструкции.

Следует отметить, что все факторы, ограничивающие рост культуры микроводорослей, можно разделить на 3 категории: световые условия, газовое обеспечение и минеральные компоненты питательной среды. Общее влияние упомянутых факторов определяет форму накопительной кривой. Верно и обратное утверждение – по форме накопительной кривой можно судить о лимитирующих рост факторах, последовательности их действия [8].

Как показано в работах [3, 5, 13, 16, 19], накопительную кривую можно разделить на следующие фазы роста: лаг-фаза, экспоненциальная (логарифмическая), линейная фазы, фаза замедления роста, стационарная фаза и фаза отмирания. Максимальная удельная скорость роста культуры микроводорослей наблюдаются на экспоненциальной фазе: биомасса растёт по экспоненциальному закону, что подразумевает отсутствие лимитирующих факторов. Единственным ограничивающим фактором является только величина внешнего светового потока. При увеличении освещённости (если минерального и газового субстрата достаточно) увеличится и удельная скорость роста культуры. В пределе, при некоторой пороговой освещённости, будем наблюдать максимально возможную удельную скорость роста. С другой стороны, уменьшение светового потока приведёт к уменьшению скорости роста культуры.

Удельная освещённость клеток складывается из поверхностной освещённости, которая обусловлена мощностью световой решетки (ламп), освещаемого слоя фотобиореактора (толщина фотобиореактора) и интенсивности перемешивания культуры. Для реализации максимальной скорости роста необходимы мощные лампы, тонкий освещаемый слой при активном перемешивании суспензии. Выполнение этих условий требует специального дорогостоящего оборудования. Поэтому нами в качестве стандарта выбрана световая решетка укомплектованная десятью недорогими 18 Вт лампами, обеспечивающая поверхностную освещённость $10\text{--}5 \text{ кЛк}$ ($42\text{--}21 \text{ Вт/м}^2$ на расстоянии 5-30 см от ламп). Для обеспечения достаточного количества биомассы для ежедневного отбора проб оптимальным является компромисс между толщиной освещаемого

слоя и общим объемом фотобиореактора при его небольших линейных размерах и весе. Опыт культивирования микроводорослей в отделе биотехнологий и фиторесурсов показывает, что минимальный объем фотобиореактора, обеспечивающий условное невмешательство в процессы роста, составляет 3 литра. Исходя из размера световой решетки и объема культиватора, освещаемый слой фотобиореактора будет составлять 5 см. Для поддержания постоянства освещенности фронтальные стенки фотобиореактора требуется делать из стекла. Последнее в отличие от оргстекла с течением времени не мутнеет. Также для увеличения удельной освещенности клеток боковые грани фотобиореактора необходимо выполнить из зеркала.

Максимальная продуктивность культуры наблюдается на линейной фазе. В соответствии с теорией о лимитирующих факторах [21, 24, 25], показано, что линейный рост возможен только в случае постоянства потока лимитирующего субстрата на систему культивирования. В работе [8] обосновано, что свойством постоянства потока лимитирующего субстрата на систему культивирования, обладает только газовая составляющая в форме углекислого газа, что подтверждается экспериментальными данными [7]. Поэтому для обеспечения максимальной продуктивности необходимо увеличить подачу углекислого газа в фотобиореактор до максимального предела, который составляет 5 % от газовой смеси [10]. Реализация данного режима возможна при использовании стандартного аквариумного насоса, баллона с углекислотой и смесителя с обратным клапаном. Кроме снабжения клеток углекислотой, компрессор обеспечивает перемешивание суспензии для равномерного распределения клеток в культиваторе и, соответственно, равномерного освещения. Так же компрессор обеспечивает вынос кислорода, являющимся побочным продуктом фотосинтеза, и ингибитором роста. Для улучшения перемешивания нижняя грань фотобиореактора должна быть расположена под углом 25 градусов.

При подборе материалов установки необходимо учитывать не только их пригодность для исследования ростовых процессов культур микроводорослей, но и ценовой фактор. Так, например, установочную площадку лучше выпол-

нить из пластика, цена которого в розничной торговле в несколько раз ниже ламинированных деревянных поверхностей. При этом пластиковые поверхности надежнее и долговечнее ламинированных в условиях постоянного контакта с водными растворами.

При выборе материала вертикальных стоек установочной площадки желательно использовать металлические никелированные трубки, покрытие которых устойчиво к воздействию водных растворов.

Для обеспечения непрерывного режима культивирования необходимо включить в конструкцию установки дозирующее устройство, емкости для питательной среды и сбора урожая. Наиболее простая, надежная и дешевая реализация дозирующего устройства представляет собой программируемое реле времени и электромагнитный проточный клапан. Преимуществом данной конструкции является возможность управления процессами роста культуры в широком диапазоне плотностей (скоростей), что необходимо для исследования влияния различных факторов внешней среды на рост и физиологическое состояние культуры низших фототрофов.

Описание установки.

Установка для культивирования микроводорослей состоит из установочной площадки, двух фотобиореакторов, систем освещения, термостабилизации, газообеспечения, а также системы обеспечения непрерывного режима культивирования (рис. 1).

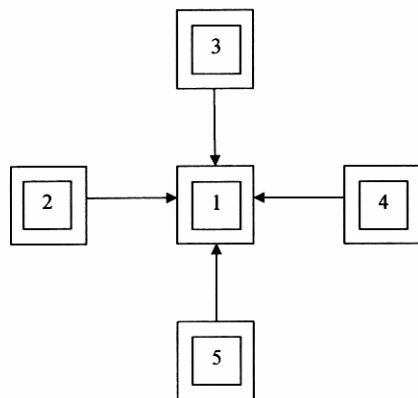


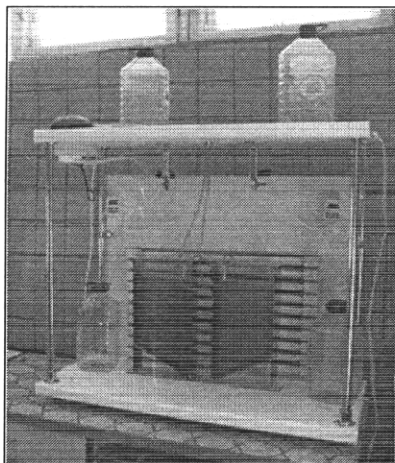
Рисунок 1. Блок-схема установки. 1 – фотобиореактор; 2 – система освещения; 3 – система газообеспечения; 4 – система термостабилизации; 5 – система обеспечения непрерывного культивирования.

Установочная площадка. Установочная площадка представляет собой настольную конструкцию размерами

1000×800×500. Вертикальные стойки и их крепления выполнены из металлических никелированных трубок диаметром 25 мм, а полки – из белого пластика толщиной 20 мм. На нижней площадке расположены два фотобиореактора и сливные емкости системы обеспечения непрерывного режима культивирования.

Рисунок 2. Общий вид установки для исследования низших фототрофов.

На верхней площадке расположены емкости для питательной среды, компрессор, электромагнитный клапан. В центре верхней площадки сделано отверстие для подвода шлангов с воздухом к фотобиореактору и шлангов с питательной средой к электромагнитному клапану.



Фотобиореактор. Фотобиореактор

представляет собой емкость из стекла размером 400×200×50 (плоскопараллельный тип) с рабочей толщиной 50 мм, т.е. выполняется условие перпендикулярности вектора светового потока к поверхности 400×200. Рабочий объем реактора – 3 л.

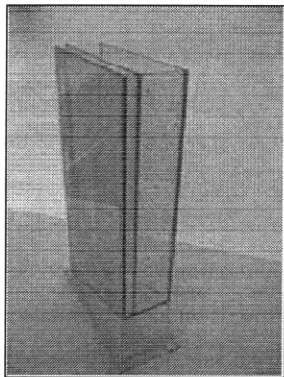


Рисунок 3. Внешний вид фотобиореактора.

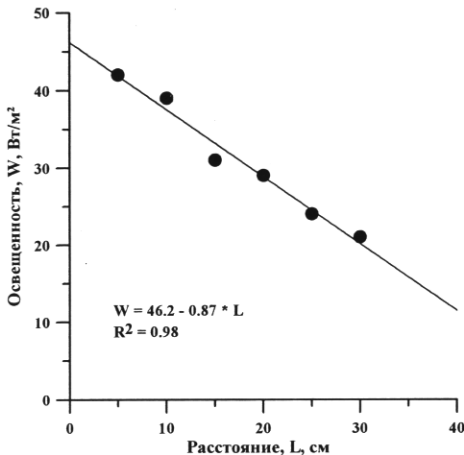
Нижняя грань сделана под углом 25 градусов с целью улучшения перемешивания суспензии. Сверху фотобиореактор закрывается крышкой из стекла, в которой имеются 2 отверстия для подачи воздуха, питательной среды. Все стеклянные элементы фотобиореактора склеены аквариумным силиконом.

Система освещения. В качестве источника света используется горизонтальная световая решетка, состоящая из 10 ламп дневного света General Electric F18W/54-765.

Таблица 1

Зависимость поверхностной освещенности фотобиореактора от расстояния до ламп световой решетки

Расстояние: реактор-лампы	5 см	10 см	15 см	20 см	25 см	30 см
Облученность, кЛк	10,5	9,6	8	7	6	5
Освещенность, Вт/м ²	42	39	31	29	24	21



Корпуса ламп симметрично относительно краев закреплены на ламинированную ДВП размерами 900×800. Лист ДВП с помощью захватов закреплен на тыльную

Рисунок 4. Зависимость поверхностной освещенности фотобиореактора от расстояния до ламп световой решетки.

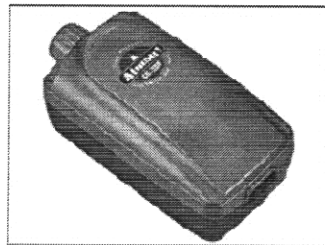
сторону металлического каркаса. Средняя освещенность на поверхности фотобиореакторов составляет

10 кЛк на расстоянии 5 см от ламп. Интенсивность поверхностной радиации можно регулировать, изменяя расстояние между лампами и фотобиореактором или устанавливая между ними нейтральные светофильтры.

Система газообеспечения. Данный элемент установки обеспечивает перемешивание суспензии микроводорослей внутри фотобиореактора для равномерного распределения питательных веществ между клетками, а также подачу в фотобиореактор углекислого газа и вынос кислорода, являющегося побочным продуктом фотосинтеза. Основным элементом системы является аквариумный

компрессор типа CR-40R с двумя выходами, производительностью 2 л/мин и максимальным

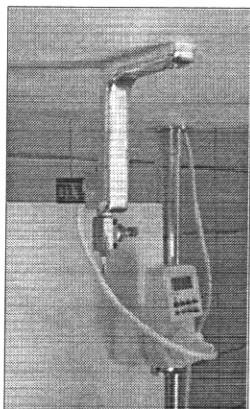
Рисунок 5. Компрессор CR-40R.



давлением 0,022 Мпа. С помощью гибкого силиконового шланга диаметром 5 мм воздух подается непосредственно в фотобиореактор через

отверстие в крышке. На конце шланга закреплена стеклянная трубочка длиной 35 см, что обеспечивает подачу воздуха в нижнюю часть фотобиореактора.

Система термостабилизации. Фотобиореактор оснащен системой охлаждения (водяной рубашкой) размерами 400×200×10. Во избежание образования воздушных пробок и пузырей внутри рубашки водяной ток направляется снизу вверх. Увеличение либо уменьшение скорости потока воды через водяную рубашку позволяет поддерживать температуру в фотореакторе на заданном уровне.



Система для обеспечения непрерывного режима культивирования. Система обеспечивает рост микророслей в режиме хемостата. В качестве емкости для питательной среды используется 5-и литровый пластиковый бочонок. Основными элементами системы являются программируемое реле времени (FERON TM22)

Рисунок 6. Внешний вид реле времени и электромагнитного клапана.

и электромагнитный клапан (CAMOZZI A331-1C2-A7E). Реле времени подключается в розетку, расположенную на листе крепления ламп световой решетки. Электромагнитный клапан с помощью кронштейна крепится над фотобиореактором. Питательная среда через соединительный шланг самотеком поступает к электромагнитному клапану, который находится в нормально закрытом состоянии. При включении программируемого реле времени, на клапан подается напряжение 220 В, он открывается, и питательная

среда поступает в фотобиореактор. Скорость подачи питательной среды регулируется с помощью ручки на клапане, а также программно, с помощью временного реле. В максимально открытом состоянии клапана за одну минуту в фотобиореактор поступает 120 мл питательной среды. Минимально возможное время между включением и выключением клапана составляет 1 мин и определяется программой на таймере. Система настроена на 10 включений в сутки продолжительностью 1 мин. Таким образом, максимальная удельная скорость протока составляет $0,40 \text{ сут}^{-1}$. Для увеличения скорости протока свыше $0,40 \text{ сут}^{-1}$ необходимо выставить на таймере время включения 2 или более минуты.

Измеритель освещенности. Датчик – измеритель освещенности предназначен для определения количества световой энергии, падающей на поверхность фотобиореактора от люминесцентных ламп дневного света типа 54-765. Чувствительность датчика 100 мВ на 10 кЛк падающей радиации, что соответствует 40 Вт/м^2 для указанного источника излучения. Линейная зависимость между освещенностью и вольт-амперными характеристиками датчика сохраняется в пределах 0-200 мВ, то есть 0-20 кЛк, что и составляет измерительный диапазон прибора.

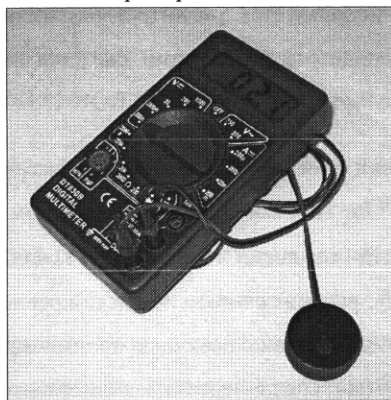


Рисунок 7. Внешний вид измерителя освещенности.

Приёмником излучения в датчике является фотодиод ФД-263, имеющий максимальную спектральную чувствительность около 800 нм. Для коррекции спектральной чувствительности прибора в области максимального поглощения пиг-

ментами водорослей, во входном окне датчика использован компаундный светофильтр на основе эпоксидной смолы и порошка медного купороса. Результа-

рующая спектральная чувствительность датчика имеет максимум 450-500 нм. Преобразование тока фотодиода в напряжение осуществляется с помощью резистора, которым также корректируется и чувствительность датчика. Датчик подключен к цифровому мультиметру DT-830B на диапазоне «напряжение», а также может быть подключен к любому высокоомному вольтметру.

Апробация установки.

Установка успешно прошла испытания при интенсивном культивировании трёх видов микроводорослей в отделе биотехнологий и фиторесурсов Ин-БЮМ НАНУ (г. Севастополь). На рис. 8 представлена динамика роста микроводорослей. Культура *Dunaliella salina* выращивалась на среде Ben-Amotz. Рост культуры регистрировали фотометрическим методом на приборе КФК-2 на длине волны 750 нм в кюветках 0,5 см. Линейная фаза роста продолжалась со вторых по пятые сутки. Рассчитанное значение максимальной продуктивности использовали для построения прогностической кривой роста дуналиеллы в условиях непрерывной культуры. Для верификации данного уравнения на 11 сутки эксперимента была установлена удельная скорость протока $0,42 \text{ сут}^{-1}$. При достижении плотностью культуры стационарного динамического равновесия на уровне $0,47 \text{ г АСВ/л}$, на 23 день эксперимента удельная скорость протока была изменена на $0,2 \text{ сут}^{-1}$. Это привело к увеличению плотности культуры и достижению ей стационарного динамического равновесия на уровне $0,98 \text{ г АСВ/л}$. Соответствие экспериментальных данных и прогностических кривых представлено на рис. 9.

Культура *Spirulina platensis* выращивалась на среде Zarrouk. Освещаемая поверхность (рабочая поверхность) культиватора № 1 составляла $0,059 \text{ м}^2$, а культиватора № 2 – $0,039 \text{ м}^2$. Рассчитали величины кинетических характеристик роста спироулины при различных освещаемых поверхностях фотобиореактора. Стоит отметить, что все остальные факторы, влияющие на скорость роста спироулины, были одинаковы.

В варианте № 1 и в варианте № 2 (рис. 10) экспоненциальная фаза роста продолжалась от момента начала эксперимента по вторые сутки. Линейная фаза

роста в варианте № 1 продолжалась со вторых по четвертые, а в варианте № 2 – со вторых по пятые сутки. Результаты расчетов занесены в табл. 2. Анализируя полученные значения, видим, что ухудшение световых условий (уменьшение освещаемой поверхности), приводит к изменению кинетических характеристик роста спирулины. Значения максимальной удельной скорости роста и максимальной продуктивности фактически (в пределах ошибки измерения) не различаются, в то время как удельная скорость дыхания культуры во втором варианте увеличилась в 2 раза. Этот факт говорит о том, что при данных условиях культивирования ухудшение световых условий оказывает влияние только на фазе замедления роста, когда плотности культуры довольно высоки. Увеличение дыхания приводит к уменьшению стационарного значения биомассы для варианта № 2.

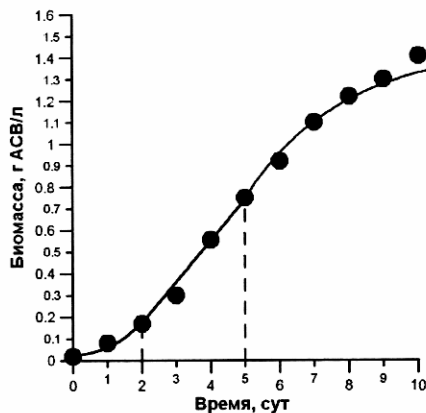


Рисунок 8. Накопительная кривая роста культуры *Dunaliella salina*. Пунктиром отмечены границы фаз роста. Линии – аппроксимация фаз роста соответствующими уравнениями протока среды.

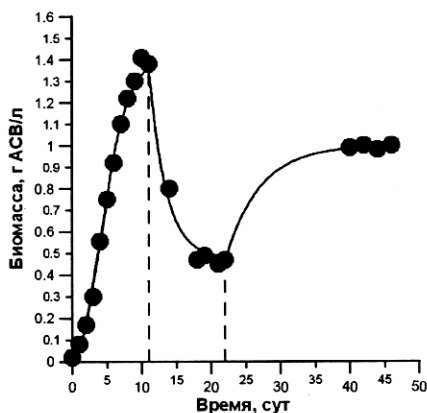


Рисунок 9. Динамика роста культуры *Dunaliella salina*. Пунктиром отмечены моменты включения протока. Линии – прогностические кривые.

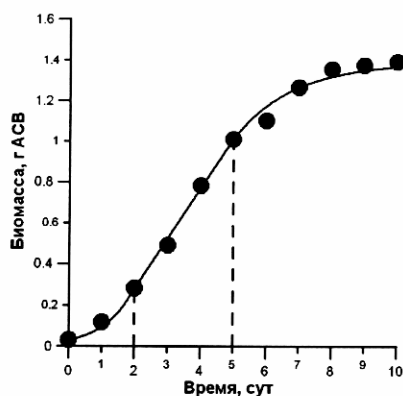
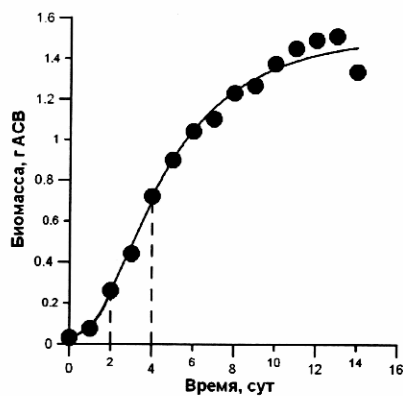


Рисунок 10. Накопительные кривые спирулины при различных освещаемых поверхностях. Пунктиром отмечены границы фаз роста. Линии – аппроксимации фаз роста соответствующими уравнениями.

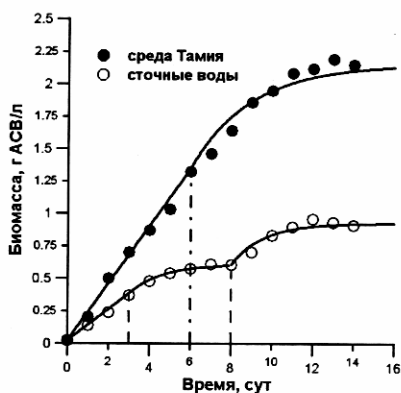


Рисунок 11. Динамика биомассы *Scenedesmus sp.* в культуральной среде. Линии – аппроксимация линейной фазы и фазы замедления. Пунктиром отмечены границы фаз роста.

Культура *Scenedesmus sp.* выращивалась на среде Тамия. Целью эксперимента являлось исследовать динамику роста *Scenedesmus sp.* и провести сравнительную оценку её продуктивности в накопительной культуре на сточных водах и питательной среде. Эксперимент проводился в двух культиваторах (далее варианты № 1 и 2) методом накопительных культур. В качестве контроля использовали сточную воду, которая на протяжении всего эксперимента находилась в тех же условиях, что и культиваторы. В культиваторы был внесён инокулят и питательная среда в таком количестве, чтобы начальная оптическая плотность культуры (D_{750}) составляла 0,04 единиц.

Прирост биомассы измеряли по изменению оптической плотности суспензии на СФ-2000 на длине волны 750 нм. Начальная плотность культуры *Scenedesmus sp* в культиваторах № 1 и № 2 составляла около 0,025 г АСВ/л (грамм абсолютно сухого вещества на 1 л). Динамика биомассы накопительной культуры *Scenedesmus sp* при культивировании на среде Тамия и сточных водах представлена на рис. 11.

Кривые роста во всех вариантах характеризуются отсутствием лаг-фазы и экспоненциальной фазы роста, что объясняется высоким значением начальной плотности культуры. При выращивании *Scenedesmus sp* на питательной среде Тамия линейная фаза длилась с первых по шестые сутки, а на сточных водах – с момента начала эксперимента по третьи сутки. Результаты представлены на рис. 11 и табл. 2. В культиваторе № 2 после внесения дополнительного источника минерального фосфора биомасса *Scenedesmus sp* начала увеличиваться и на тринадцатые сутки достигла 0,933 г АСВ. При этом наблюдалось снижение концентрации нитратного азота и минерального фосфора, которые достигли нуля на четырнадцатые сутки. Стоит отметить, что динамика плотности культуры полностью повторилась (рис. 11): удельная скорость дыхания, рассчитанная для второй фазы замедления равняется удельной скорости дыхания, рассчитанной для первой фазы замедления.

Анализ кинетических характеристик трёх культур микроводорослей (таб. 2) показывает общность полученных значений. Так максимальная удельная скорость роста составляла около $1,1 \text{ сут}^{-1}$, а максимальная продуктивность – 0,2 г АСВ/л·сут. Так как в применяемых питательных средах содержание биогенных элементов не одинаковое, то и величины максимальной плотности для исследуемых видов микроводорослей не совпали. Различия в плотности культур обусловили различную удельную освещенность клеток в культиваторах, что не могло не сказаться на величине дыхания.

Таблица 2

Характеристики роста накопительных культур: μ_m – максимальная удельная скорость роста, P_m – максимальная продуктивность, μ_r – удельная скорость дыхания, B_m – плотность культуры на стационарной фазе роста

Культура	Питательная среда	μ_m , сут ⁻¹	P_m , г АСВ/л·сут	B_m , г АСВ	μ_r , сут ⁻¹
<i>Spirulina platensis</i> № 1	Zarrouk	1,08	0,22	1,51	0,27
<i>Spirulina platensis</i> № 2	Zarrouk	1,10	0,24	1,39	0,56
<i>Dunaliella salina</i>	Ben-Amotz	1,10	0,20	1,41	0,35
<i>Scenedesmus</i> sp. № 1	Тамия	-	0,21	2,19	0,34
<i>Scenedesmus</i> sp. № 2	Тамия	-	0,14	0,61	0,63
<i>Spirulina platensis</i> *	Zarrouk	0,64	0,13	1,61	0,68
<i>Dunaliella salina</i> *	Ben-Amotz	0,81	0,08	0,57	0,90

* – литературные данные по росту водорослей в плоскодонных химических колбах [20].

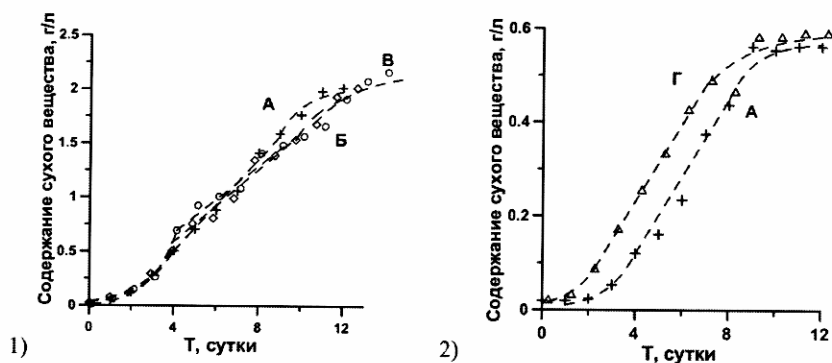


Рисунок 12. Динамика биомассы накопительных культур *Spirulina platensis* (1) и *Dunaliella salina* (2).

Для сравнения приведем данные, полученные на культурах *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* с применением плоскодонных химических колб объемом 500 мл с заданными условиями по освещенности, температуре и барботажу

близкими к трём предыдущим опытам [20]. Из табл. 2 видно, что значения скоростей роста (абсолютной P_m и относительной μ_m) ниже, чем в исследовательских культиваторах. Значения максимальной плотности равны или ниже, а величины дыхания, наоборот, выше или равны по сравнению с величинами, которые получены в опытах с применением исследовательских установок. Нельзя не оставить без внимания факт общности значений кинетических характеристик, полученных на различных культурах в одинаковых условиях установки для исследования низших фототрофов, и факт отличия кинетических характеристик, полученных на различных культурах в одинаковых условиях в химических колбах на обычном люминистате.

Таким образом, при отсутствии лимитирования роста микроводорослей минеральным субстратом и при культивировании микроводорослей в условиях оптимума влияния факторов внешней среды культуры будут проявлять общие физиологические реакции. Проведенное исследование позволяет принять к обсуждению вопрос о том, что при общности условий культивирования процессы роста водорослей различных систематических групп также будут обладать общими свойствами. Полученных данных недостаточно, чтобы уверенно утверждать о правильности данного наблюдения, что вызывает необходимость более детального исследования проблемы роста микроводорослей.

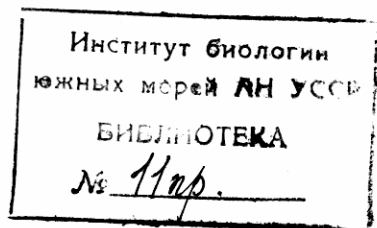
Также при работе с традиционными колбами и люминистатами более низкая плотность и меньший объем культуры накладывают ограничения на количество суспензии, которое отбирается для анализа роста, биохимического состава и т. д., что не может не сказаться на точности измерений.

Заключение.

Для исследования ростовых, биохимических и физиологических характеристик культур микроводорослей разработана установка, которая обеспечивает рост водорослей в накопительной и непрерывной культуре. Использование установки в ВУЗах и НИИ позволит получить данные о росте различных видов и штаммов водорослей в одинаковых условиях, что важно для сравнения их био-

логических свойств. А также позволит корректно сравнивать экспериментальные данные, полученные различными исследователями.

Основываясь на известных представлениях роста микроводорослей, создана оптимальная конструкция, которая обеспечивает контроль над основными параметрами роста и физиологического состояния, а также возможность простого управления ими. Отличительными особенностями данной разработки является простота, надежность конструкции и легкость замены элементов, а также дешевизна установки в целом.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НАКОПИТЕЛЬНОЙ КРИВОЙ.

Область и диапазон применения.

Процедура описывает метод определения кинетических характеристик накопительной кривой: максимальной удельной скорости роста, максимальной продуктивности и удельной скорости дыхания. Снятие накопительной кривой допускается различными способами: подсчет клеток, определение АСВ, оптические методы и др. Полученные данные необходимо пересчитать на АСВ, используя известные эмпирические коэффициенты.

В основе метода лежит деление накопительной кривой на следующие фазы: лаг-фаза, экспоненциальная фаза, линейная фаза, фаза замедления роста, стационарная фаза и фаза отмирания. Каждая фаза характеризуется постоянством какого-либо кинетического параметра [16]. Описанный способ расчета кинетических характеристик роста носит приближенный характер из-за условности границ фаз роста, но он незаменим для сравнения различных накопительных кривых роста. Стоит отметить, что чем больше экспериментальных точек на каждой фазе накопительной кривой, тем выше качество расчетных характеристик.

Теоретическое введение.

Основной кинетической характеристикой роста микроводорослей является скорость роста, которая определяется процессами фотобиосинтеза и зависит от скорости синтеза биомассы. В общем случае, рост и биосинтез компонентов клетки является результатом двух процессов: собственно фотосинтеза и дыхания [16, 17]. Расходы на дыхание, связанные с ростом (фотодыхание) пропорциональны "чистому" фотосинтезу, их трудно вычлениить из общего процесса, обычно при моделировании подразумевается, что "чистый" фотосинтез уже включает этот процесс. Поэтому рост можно рассматривать как разность двух процессов: "чистого" фотобиосинтеза и "темнового" дыхания. Итак, продук-

тивность (скорость роста) культуры – это кинетическая характеристика, показывающая количество синтезируемой биомассы в единицу времени:

$$P = \frac{dB}{dt}$$

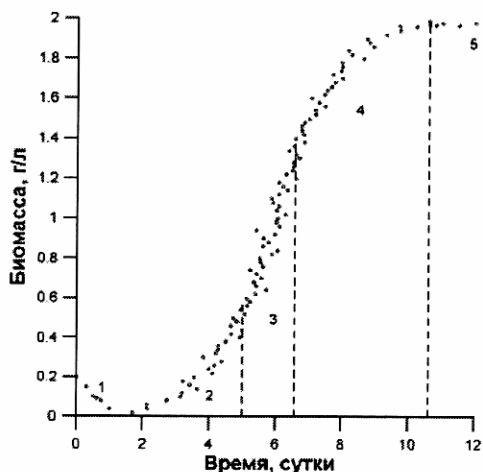
Удельная скорость роста – кинетическая характеристика, показывающая сколько единиц биомассы синтезирует каждая единица биомассы в единицу времени:

$$\mu = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt}$$

Удельная скорость дыхания – кинетическая характеристика, показывающая относительное количество биомассы, распадающейся в единицу времени.

$$\mu_r = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB_r}{dt}$$

Определение этих параметров позволит количественно описать динамику роста микроводорослей в условиях периодического (накопительного) культивирования.



Для проведения подобного анализа рассмотрим накопительную кривую, представленную на рисунке 1.

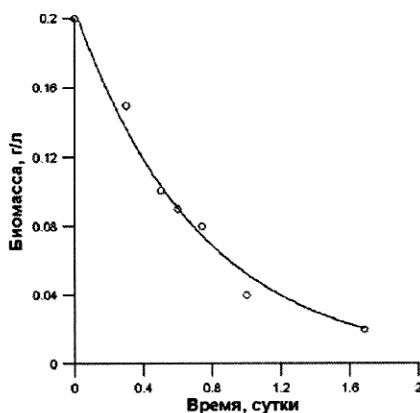
Рисунок 1. Накопительная кривая и фазы роста: 1 - лаг-фаза, 2 - экспоненциальная, 3 - линейная, 4 - замедления, 5 - стационарная.

Лэг-фаза.

Как правило, для перво-

начального периода роста и развития культуры характерно либо отсутствие роста, либо скорость отрицательна, при этом происходит уменьшение числа клеток или биомассы. В это время клетки микроводорослей адаптируются к новым условиям среды. Длительность периода занимает от нескольких минут до нескольких суток, в зависимости от различия условий, в которых клетки находились до внесения их в данную среду и новыми условиями. Динамика роста культуры на этой фазе описывается зависимостью:

$$B = B_0 \cdot e^{(-\mu_r \cdot (t-t_0))}$$



где μ_r — удельная скорость темнового дыхания (расхода биомассы на поддержание структуры); B_0 — биомасса в начальный момент времени t_0 .

Рисунок 2. Аппроксимация лаг-фазы уравнением

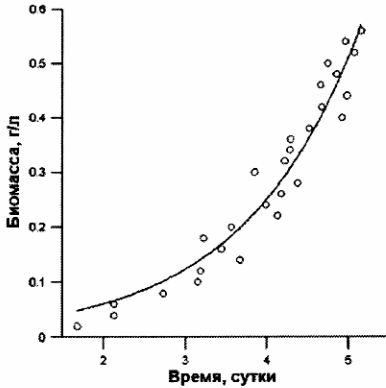
Аппроксимируем лаг-фазу роста данным уравнением, предварительно задавая значения B_0 и t_0 (см. рис. 2).

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза.

Величина удельной скорости в этой фазе роста определяется, в основном, световыми условиями, которые для низких плотностей культуры неизменны, т.к. клетки не затеняют друг друга. Этот период характеризуется постоянством удельной скорости роста: $\mu_m = const$. Для логарифмической фазы роста применима зависимость плотности культуры от времени в следующем виде:

$$B = B_{ln} \cdot e^{(\mu_m \cdot (t-t_{ln}))}$$

где μ_m — максимальная удельная скорость роста, B_{ln} — концентрация биомассы в момент времени t_{ln} .



Аппроксимируем экспоненциальную фазу роста данным уравнением, предварительно задавая значения B_{ln} и t_{ln} .

Рисунок 3. Аппроксимация экспоненциальной фазы уравнением

Результаты представлены на рисунке 3. Продолжительность экспоненциальной фазы определена на рисунке 1.

Фаза линейного роста.

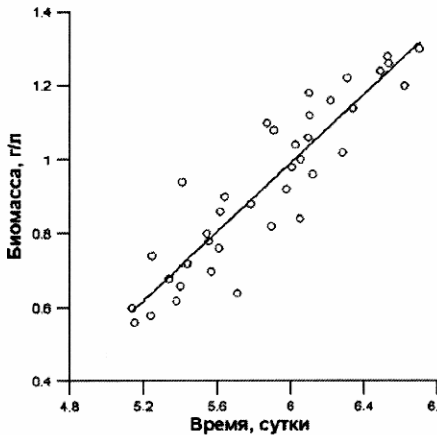
Практически всегда на кривой роста микроводорослей можно выделить прямолинейный участок. Это указывает на постоянство скорости роста (продуктивности культуры, $P = P_m = const$). Как правило, на линейном участке скорость роста определяется величиной внешнего потока углерода в газообразной форме, который полностью поглощается культурой и ограничивает продуктив-

ность культуры в целом. Для фазы линейного роста зависимость биомассы от времени записывается в следующем виде:

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l)$$

где B_l – концентрация биомассы в момент начала линейной фазы t_l .

Рисунок 4. Аппроксимация фазы линейного роста уравнением.



Аппроксимируем экспоненциальную фазу роста данным урав-

нением, предварительно задавая значения B_l и t_l .

Результаты представлены на рисунке 4.

Фаза замедления.

Фаза замедления роста у микроводорослей характеризуется тем, что скорость роста на этом участке накопительной кривой уменьшается. Это замедление может быть вызвано двумя причинами. В одном случае происходит смена лимитирующего фактора, т.е. концентрация какого либо биогенного элемента в среде уменьшается до уровня, при котором скорость синтеза определяется уже данным элементом, согласно кинетике Михаелиса-Ментен. В конце фазы скорость роста снизится до нуля. В другом случае плотность культуры достигает величины, при которой скорость синтеза, определяемая внешним потоком, становится сравнимой со скоростью дыхания культуры, т.е. в конце фазы культура достигает компенсационного пункта фотосинтеза. Эта фаза характеризуется постоянством удельной скорости дыхания μ_r . Для фазы замедления зависимость биомассы от времени записывается в следующем виде:

$$B = B_m + (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r(t-t^l)}$$

где B_m — концентрация биомассы на стационарной фазе; B^l — концентрация биомассы в конце линейной фазы t^l .

Аппроксимируем фазу замедления роста данным уравнением, предварительно задавая значения B_m , B^l и t^l .

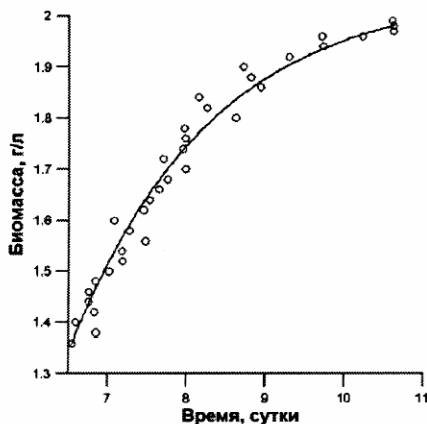


Рисунок 5. Аппроксимация фазы замедления уравнением.

Результаты представлены на рисунке 5. Продолжительность фазы замедления принята равной с шестых суток (включительно) по одиннадцатые.

Стационарная фаза.

Характеризуется прекращением роста микроводорослей ($\mu = 0$, $P = 0$). Культура достигает максимальной

плотности B_m , величина которой зависит от световых условий, первоначальной концентрации субстрата, газовой среды и других физико-химических условий. При этом стационарность плотности по биомассе может не совпадать со стационарностью по концентрации клеток. Длительность стационарной фазы различна и может достигать нескольких суток. Для описания динамики биомассы на этой фазе используется выражение:

$$B = B_m$$

где B_m - концентрация биомассы на стационарной фазе.

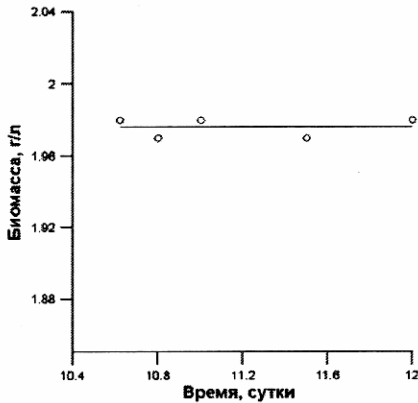


Рисунок 6. Аппроксимация стационарной фазы уравнением.

У представленной накопительной кривой продолжительность стационарной фазы роста указана на рисунке 6. Аппроксимируя стационарную фазу данным уравнением, получаем значение B_m .

Фаза отмирания.

В фазе отмирания наблюдается превалирование процессов дыхания над процессами синтеза. Скорости роста (отрицательные) будут равны скоростям распада. В фазе отмирания происходят глубокие физиологические изменения клеток микроводорослей, вплоть до их гибели. Происходит распад биомассы, что, как правило, приводит к развитию бактерий. Возникает некий новый альго-бактериальный ценоз, т.е. культура микроводорослей прекращает существование. Если культуру микроводорослей из этой фазы использовать в качестве инокулята для новой периодической культуры, то часть клеток не сможет возвратиться к нормальной жизнедеятельности. Уравнение динамики плотности культуры в фазе отмирания аналогично уравнению для лаг-фазы:

$$B = B_m \cdot e^{(-\mu_r \cdot (t - t^s))}$$

где μ_r — удельная скорость темнового дыхания, B_m — плотность культуры на стационарной фазе, t^s — время окончания стационарной фазы.

В нашем случае (см. рис. 1) фаза отмирания отсутствует. Определение характеристик культуры здесь происходит аналогично, используя последнее уравнение.

Заключение.

Полученные значения кинетических характеристик роста подставим в уравнения, тем самым мы функционально задаем рост культуры на каждой из фаз. Это позволит вычислить плотность культуры в произвольный момент времени, а также при проведении повторных экспериментов в будущем при аналогичных условиях.

Рассматривая накопительную кривую в целом, заметим, что на границах фаз роста из-за ошибок измерений или определения характеристик культуры будет наблюдаться либо неоднозначность, либо изломы, что никак не вписывается в представление о непрерывности функции роста. Однако, уменьшение измерительной ошибки и промежутка между измерениями устранил указанное несоответствие.

Если в опытах измеряются биохимические показатели, то полученные уравнения можно применить для описания динамики исследуемых компонентов клеток и найти соотношение кинетических характеристик, например, количественно описать динамику содержания данного компонента в биомассе или в клетке. Такая количественная оценка очень важна для прогнозирования роста и состава клеток при изменении условий выращивания.

Все ростовые характеристики и уравнения роста культуры на каждой фазе можно свести в таблицу:

Фазы роста	Кинетические характеристики	Уравнения роста
Лag-фаза	$\mu_r = 1.37$	$B = 0.2 \cdot e^{-1.37t}$
Логарифмическая	$\mu_m = 0.71$	$B = 0.02 \cdot e^{0.71(t-1.68)}$
Линейная	$P_m = 0.47$	$B = 0.56 + 0.47 \cdot (t - 5.15)$
Замедления	$\mu_r = 0.56$	$B = 1.98 - (1.98 - 1.36) \cdot e^{-0.56(t-6.55)}$
Стационарная	$B_m = 1.98$	$B = 1.98$
Отмирания	не анализировалась	

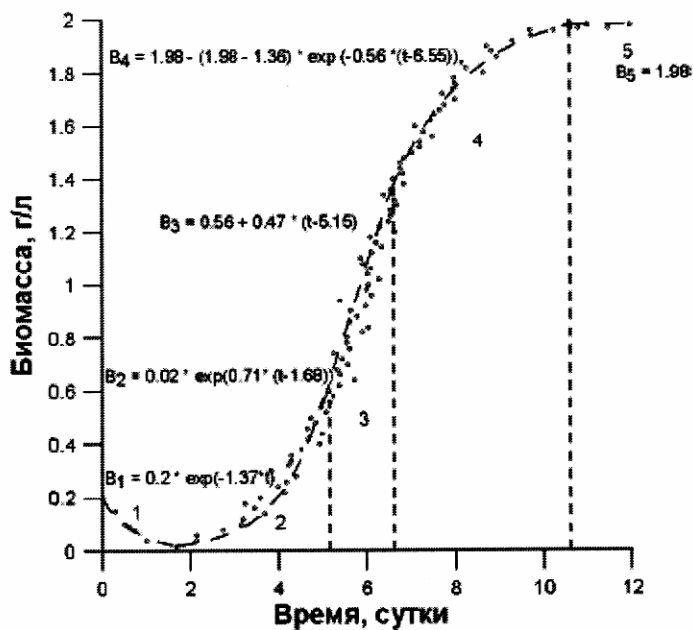


Рисунок 7. Соответствие расчетных кривых и экспериментальных данных.

ПРОПИСИ РЕКОМЕНДУЕМЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.

Среда « Goldberg »

в модификации Кабановой, 1958

Компоненты:	мл
1. Морская вода	1000
2. Раствор 1	2
3. Раствор 2	0.5
4. Раствор 3	1
Состав растворов:	г/л
1. KNO_3	101.0
2. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	14.21
3. Микроэлементы	
a) $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.2703
b) $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0.1979
c) $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.2379

Вид водорослей:

Все морские.

Комментарий:

Для приготовления среды можно использовать дистиллированную воду, предварительно добавив 30 г сухой морской соли [4].

Среда « f/2 »

Компоненты:	г/л	мл/л
	A	B
1. NaNO_3	75.0	1.0
2. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	5.0	1.0
3. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$	30.0	1.0
4. Микроэлементы		1.0
5. Витамины		0.5
6. Морская вода		до 1 л
Состав раствора микроэлементов:	г/л	
1. $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	3.15	
2. Na_2EDTA	4.36	
3. $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0.010	
4. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.006	
5. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.022	
6. $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.010	
7. $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0.180	

Состав раствора витаминов:		г/л
1. Тиамин (В ₁)		0.200
2. Биотин (Н)		0.001
3. Цианокобаламин (В ₁₂)		0.001

Вид водорослей:

Все диатомеи. Без компонента №3 подходит для всех морских видов.

Комментарий:

А – состав маточных растворов. В – объём маточных растворов, вносимых в стерильную морскую воду. Маточные растворы микроэлементов и витаминов готовятся на дистиллированной воде. Раствор витаминов хранится в холодильнике [4].

Среда « Тамия »

в модификации Кузнецова, Владимировой, 1964

Компоненты:		г/л
1. KNO ₃		5.0
2. MgSO ₄ × 7 H ₂ O		2.5
3. KH ₂ PO ₄ × 3 H ₂ O		1.25
4. Na ₂ EDTA		0.037
5. FeSO ₄ × 7 H ₂ O		0.009
6. Микроэлементы		1мл

Состав раствора микроэлементов:

1. H ₃ BO ₃	2.860	
2. MnCl ₂ × 4 H ₂ O	1.810	
3. ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0.222	
4. MoO ₃	0.015	
а. (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O		0.023
5. NH ₄ VO ₃	0.023	

Вид водорослей:

Chlorella vulgaris

Комментарий:

Для приготовления среды используется дистиллированная или кипяченая вода [4].

Среда « Артари »

Компоненты:		г/л
1. NaCl		116.0
2. MgSO ₄ × 7 H ₂ O		50.0
3. KNO ₃		2.5
4. K ₂ HPO ₄		0.2
5. NaHCO ₃		1.0
6. Железо-аммиачные квасцы		0.014
7. Микроэлементы		1 мл

Состав раствора микроэлементов:

1. H_3BO_3	2.860
2. $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1.810
3. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.222
4. MoO_3	0.015
5. NH_4VO_3	0.023

Вид водорослей:

Dunaliella salina Teod.

Комментарий:

Для приготовления среды используется дистиллированная вода [9].

Среда « Ben-Amotz »**Компоненты:**

г/л

1. NaCl	58.5
2. KNO_3	0.505
3. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1.23
4. $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.147
5. $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0.038
6. Na_2EDTA	0.04
7. $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.00054
8. $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0.0001
9. $\text{CuCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0.0001
10. $\text{ZnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0.0001
11. $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.0001
12. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0.001236
13. NaHCO_3	4.2

Вид водорослей:

Dunaliella salina Teod.

Комментарий:

Для приготовления среды используется дистиллированная вода [27].

Среда « Тренкеншу »**Компоненты:**

г/л

	A	B
1. NaNO_3	1.8	1.2
2. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.3	0.45
3. Na_2EDTA	0.037	0.037
4. $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.042	0.0265
5. $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0.008	0.004
6. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.00625	0.0031
7. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0.00183	0.0009
8. $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \times 24 \text{H}_2\text{O}$	0.00238	0.0017
9. TiO_2	0.00058	--

Вид водорослей:

A - *Tetraselmis viridis* Rouch., *Dunaliella salina* Teod.

B - *Porphyridium purpureum* Naegli.

Комментарий:

Для приготовления среды используется морская вода. Культивирование осуществляют с применением газо-воздушной смеси с 3-5% углекислого газа [18].

Среда « Zarrouk »

Компоненты:	г/л
1. NaHCO_3	16.8
2. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0.66
a. $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0.39
b. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ – по Пиневицу	1.00
3. NaNO_3	2.5
4. $\text{K}_2\text{SO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1.0
5. NaCl	1.0
6. Na_2EDTA	0.08
7. $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.01
8. $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.04
9. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2
10. Раствор микроэлементов	1 мл

Состав раствора микроэлементов:

	Раствор 1.
1. H_3BO_3	2.860
2. $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1.810
a. MnSO_4	1.380
3. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.222
4. $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0.080
5. MoO_3	0.015
a. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.023
	Раствор 2.
6. $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.045
a. NiCl_2	0.040
7. NH_4VO_3	0.023
8. $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.018
9. $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.044
a. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.049
10. $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \times 24 \text{H}_2\text{O}$	0.096

Вид водорослей:

Arthrospira (spirulina) platensis.

Комментарий:

Для приготовления 1л среды берется 900 мл дистиллированной воды, в которых растворяются навески основного раствора. Отдельно в 100 мл растворяются навески: 6 - 9. Затем добавляется 1 мл раствора микроэлементов [4].

Среда « Громов №6 »

Компоненты:	г/л	
1. KNO_3	1.0	
2. K_2HPO_4	0.2	
а. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$		0.26
3. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2	
4. CaCl_2	0.15	
5. NaHCO_3	0.2	
6. Микроэлементы	1 мл	

Состав раствора микроэлементов:

1. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.222
2. MnSO_4	1.810
3. $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0.079
4. $\text{NaBO}_3 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	2.630
5. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	1.000
6. $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	9.300
7. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.020
8. Na_2EDTA	10.00

Вид водорослей:

Nostoc sp.

Комментарий:

Для приготовления среды используется дистиллированная вода [22].

Среда « MN1 »

Компоненты:	г/л	
1. KNO_3	0.50	
2. K_2HPO_4	0.45	
а. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$		0.59
3. NaHCO_3	0.05	
4. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.1	
5. CaCl_2	0.11	
6. Микроэлементы	1 мл	

Состав раствора микроэлементов:

1. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.05
2. MnSO_4	2.00
3. H_3BO_3	0.85
4. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	2.25
5. $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	4.0
6. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.009
7. Na_2EDTA	4.75

Вид водорослей:

Nostoc linckia (Roth) Born et Flah

Комментарий:

Для приготовления среды используется дистиллированная вода [22].

ИНСТРУКЦИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ ОСНОВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ УСТАНОВКИ

Фотобиореактор

Перед началом и в конце эксперимента фотореактор необходимо промыть порошком, тщательно ополоснуть водой, а затем обмыть стенки разбавленной соляной кислотой (1:1), чтобы не допустить заражение культуры. Кислоту необходимо смыть со стенок семью объёмами дистиллированной воды. Ежедневно в процессе эксперимента необходимо производить перемешивание культуры с помощью ершика. Это необходимо для остановки пристеночного роста водорослей и их равномерного распределения в суспензии при отборе проб. В качестве ершика можно использовать палочку из оргстекла или пластика, покрытую слоем полиизола (1-2 мм).

При культивировании микроводорослей в режиме периодической (накопительной) культуры отверстие для слива, расположенное на боковой стенке сверху должно быть заглушено с помощью пробки. Если культура выращивается в непрерывном режиме (хеомат) в данное отверстие вставляется гибкий шланг, с помощью которого производится отбор урожая.

Система термостабилизации

Фотобиореактор оснащен водяной рубашкой. К нижнему отверстию водяной рубашки с помощью гибкого шланга подводится охлаждающая жидкость (вода). Верхнее отверстие предназначено для отвода теплоносителя (воды). В рубашке предусмотрено аварийное отверстие: если отводное отверстие забилося или "завоздушилось" теплоноситель не попадет в фотореактор, а будет стекать на установочную площадку. В качестве теплообменника возможно использовать современные ультратермостаты, которые позволяют поддерживать заданную температуру как в теплое, так и в холодное время года. Также в качестве теплоносителя возможно использовать водопроводную воду.

Система газообеспечения

При подготовке системы к работе к компрессору присоединяются гибкие силиконовые шланги, на конце которых прикреплена стеклянная трубочка диаметром 5 мм. Перед подключением все трубочки должны быть промыты разбавленной соляной кислотой (1:1) и дистиллятом во избежание заражения культуры. В процессе работы установки необходимо производить не реже чем 1 раз в неделю промывку стеклянных трубочек для удаления накопившихся солей. Стеклянная трубочка должна быть размещена в нижней части фотобиореактора для улучшения барботажа культуры.

При культивировании морских видов микроводорослей на средах, не содержащих источников углерода, к системе газообеспечения возможно подключение подачи углекислоты.

Система обеспечения непрерывного режима культивирования

Для обеспечения роста микроводорослей в непрерывном режиме в фотобиореактор необходима подача питательной среды. Емкость с питательной средой располагается на верхней полке установочной площадки. С помощью гибкого силиконового шланга через центральное отверстие в верхней полке питательная среда подается на вход электромагнитного клапана. На выходе клапана также крепится трубочка, подающая питательную среду непосредственно в фотобиореактор через отверстие в крышке. Клапан открывается при подаче на него напряжения 220 В. Частота и продолжительность подачи напряжения программируется с помощью таймера, к которому подключается клапан.

Перед началом работы систему необходимо заполнить питательной средой. Для этого необходимо подать напряжение на клапан с помощью кнопки *ON / AUTO / OFF* на таймере. Прозвучит характерный щелчок, что означает, что клапан открыт. С помощью резиновой груши необходимо отсосать воздух из системы подачи питательной среды. Среда потечет по шлангам и начнет выливаться из нижней трубки. Нажатием кнопки *ON / AUTO / OFF* на таймере необходимо обесточить клапан, он закроется, и питательная среда перестанет течь.

В процессе эксплуатации подводящие трубки и внутренняя часть электромагнитного клапана забивается солями. Поэтому не реже чем 1 раз в неделю необходимо производить промывку системы раствором сильно разбавленной соляной кислоты (1:20). Для этого трубку из емкости с питательной средой необходимо опустить в стакан, содержащий разбавленную кислоту, заполнить ею систему, как описано выше и хорошо промыть. После этого необходимо точно также промыть систему дистиллированной водой и заполнить питательной средой. Система снова готова к работе.

Суточный обмен в фотобиореакторе определяется степенью открытости клапана и частоты его срабатывания. В максимально открытом состоянии система обеспечивает проток около 120 - 130 мл/мин. Для уменьшения этой величины необходимо поворачивать регулировочную ручку на клапане до достижения требуемой скорости протока.

Программирование таймера

Таймер обеспечивает максимум 10 срабатываний в сутки минимум на одну минуту.

Кнопка WEEK служит для установки текущего дня недели в режиме часов и для установки комбинации дней недели, в которые произойдет срабатывание таймера. Для изменения этой комбинации необходимо нажимать на данную кнопку до тех пор, пока на экране таймера не высветится требуемая комбинация дней недели.

Смена режима часов на режим таймера производится с помощью кнопки TIMER, и, наоборот, из режима таймера в режим часов можно перейти с помощью кнопки CLOCK.

Кнопка HOUR служит для выставления часов, а кнопка MINUTE – для выставления минут.

Кнопка RESET сбрасывает все проведенные настройки, и программирование таймера можно начать сначала.

Для установки программ включения/выключения таймера необходимо нажать кнопку TIMER, тем самым перейти в режим программирования. Каждая

программа состоит из времени включения (on) и выключения (off). Нажатием кнопки WEEK устанавливаем требуемые дни недели. Например, нажимаем кнопку WEEK пока на дисплее не отобразятся все дни недели (MO, TU, WE, TH, FR, SA, SU). Далее устанавливаем время включения с помощью кнопок HOUR и MINUTE. После проведения настройки включения нажимаем кнопку TIMER и производим настройку выключения таймера. Настройка остальных девяти программ производится аналогично.

Измерение освещенности

Переключатель на мультиметре выставить в положение 200 мВ по шкале DCV. Датчик установить на поверхности фотобиореактора – зафиксировать показания мультиметра. Например, значение 90 мВ будет свидетельствовать об освещенности 9 кЛк. Так как лампы располагаются на некотором расстоянии друг от друга, а на концах ламп поток излучения ниже чем на основной их длине, то необходимо провести девять замеров освещенности по всей поверхности фотобиореактора и вывести среднее значение, которое и будет соответствовать истинному.

Список литературы

1. Водоросли: Справочник. - Киев, 1989. - 608 с.
2. Геворгиз Р. Г. Установка для культивирования морских микроводорослей / Р. Г. Геворгиз, А. П. Шахматов // Экология моря. – 2005. – № 67. – С. 44 – 47.
3. Гуревич Ю. Л. Устойчивость и регуляция размножения в микробных популяциях / Ю. Л. Гуревич. – Новосибирск, 1984. – 161 с.
4. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / отв. ред. В. Е. Семенов. – Москва : ИФР, 1991. – 231 с.
5. Кокова В. Е. Непропорционально-проточная культура простейших / В. Е. Кокова, Г. М. Лисовский. – Новосибирск: Наука, 1976. – 76 с.
6. Курс низших растений. – М.: Высшая школа, 1981. – 520 с.
7. Ладыгина Л. В. Микроводоросли как кормовые объекты личинок мидий и устриц: автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук: спец. 03.00.17 «Гидробиология» / Л. В. Ладыгина. – Севастополь, 2007. – 25 с.
8. Лелеков А. С. Простейшие модели роста микроводорослей. 4. Экспоненциальная и линейная фазы роста / А. С. Лелеков, Р. П. Тренкеншу // Экология моря. – 2007. – № 74. – С. 47 – 49.
9. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. – К: Наук. думка, 1973. – 487 с.
10. Мурадян Е. А. Влияние экстремально высокой концентрации CO_2 на функциональное состояние фотосинтетического аппарата и обмен липидов *Dunaliella salina* : автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология и биохимия растений» / Е. А. Мурадян. – Москва, 2003. – 26 с.

11. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н.В. Терентьева // МЭЖ. – 2008. – № 2. – С. 5 – 23.
12. *Перт С. Д.* Основы культивирования микроорганизмов / С. Д. Перт. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
13. *Ризниченко Г. Ю.* Лекции по математическим моделям в биологии / Г.Ю. Ризниченко. – Изд. РХД, 2002. – 236 с.
14. *Тренкеншу Р. П.* Морские микроводоросли – источник резиноидов / Р. П. Тренкеншу, И. А. Гейнрих // Экология моря. – 2000. – №. 50. – С. 75 – 77.
15. *Тренкеншу Р.П.* Одноклеточные водоросли: массовое культивирование и практическое использование / Р. П. Тренкеншу // Прикладная альгология. – 1999. – Т. 1. – С. 7 – 10.
16. *Тренкеншу Р. П.* Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура / Р. П. Тренкеншу // Экология моря. – 2005. – № 67. – С. 89 – 97.
17. *Тренкеншу Р. П.* Простейшие модели роста микроводорослей. 3. Потребность микроводорослей в элементах минерального питания / Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков // Экология моря. – 2005. – № 70. – С. 53 – 61.
18. *Тренкеншу Р. П.* Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: автореф. дисс. канд. биол. наук. - Красноярск, 1984. – 37 с.
19. *Уильямсон М.* Анализ биологических популяций / М. Уильямсон. – М.:Мир, 1975. – 271 с.
20. *Харчук И. А.* Ангидробриоз микроводорослей как способ сохранения их жизнедеятельности: автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.17 «Гидробиология» / И. А. Харчук. – Севастополь, 2008. – 24 с.

21. *Blackman F. F.* Optima and limiting factors / F.F. Blackman // *Ann. Bot. Lond.* – 1905. – Vol. 19. – P. 281 – 295.
22. *Cojocari A.* Particularitățile fiziologo-biochimice și biotehnologice ale tulpinii *Nostoc linckia* (Roth) Born et Flah CNM-CB-03 - sursă de substanțe bioactive: Autoreferat al tezei de doctor în biologie. – Chișinău, 2006. – 26 p.
23. *Fabregas J.* Renewal rate of semicontinuous culture of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharoide and fatty acid productivity / J. Fabregas, D. Garcia, E. Morales // *J. Ferment. Bioengin.* – 1998. – Vol. 86, №. 5. – P. 463 – 467.
24. *Liebig J.* Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology / J. Liebig. Lond., 1847. – 320 p.
25. *Monod J.* The growth of bacterial cultures / J. Monod // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1949. Vol. 3. – P. 371 – 394.
26. *Novick A.* Description of the chemostat / A. Novick, L. Szilard // *Scien.* – 1950. – Vol. 112. – P. 715 – 718.
27. *Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A.* Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil* // *Plant. Cell. Physiol.* - 1990. - 31, No. 5. – P. 689 – 696.
28. *Ukeles R.* Cultivation of plants / R. Ukeles // *Marine Ecology.* – 1976. – Vol. 3. – P. 367 – 420.
29. *Vonshak A.* Laboratory techniques for the cultivation of microalgae / A. Vonshak. – Handbook of micro-algal mass culture, 1986. – P. 117 – 145.

Рудольф Павлович Тренкеншу,
заведующий отделом биотехнологий и фиторесурсов.
Боровков Андрей Борисович,
младший научный сотрудник отдела биотехнологий и фиторесурсов.
Лелеков Александр Сергеевич,
младший научный сотрудник отдела биотехнологий и фиторесурсов.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, Украина
E-mail: trenkens@yandex.ru <http://biotex.ibss.org.ua>
Телефон: (+038)(0692)55-07-95

Сдано в набор 19.02.2009. Подписано к печати 26.02.2009.

Печать офсетная. Формат 84×108/32. Гарнитура литературная.
Объем: печатных листов 1,28. Тираж 200 экз. Заказ 12.

Океанологический Центр НАН Украины, 99011 Севастополь, ул. Капитанская, 2.