

Р. П. ТРЕНКЕНШУ

ПРОСТЕЙШИЕ МОДЕЛИ РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ 2. КВАЗИНЕПРЕРЫВНАЯ КУЛЬТУРА

Предложены модели для описания роста квазинепрерывной культуры микроводорослей. Управление ростом может осуществляться по плотности культуры и времени разбавления.

В первой части работы был дан анализ роста микроводорослей в периодической культуре и предложены простые математические модели для количественного описания различных фаз роста. Кинетические характеристики роста – удельная скорость и продуктивность – выражены через плотность культуры в начале или конце фазы роста. Такие, общепринятые представления о периодической культуре микроводорослей имеют существенный недостаток, связанный с некоторой условностью границ фаз роста и развития популяции клеток. Соответственно, весьма условными становятся и границы, внутри которых наблюдается периодическая культура в целом. Особенно это касается первоначальных условий процесса культивирования: количества вносимого инокулята и обеспечения светом и элементами питания. В зависимости от этих условий количество фаз роста может уменьшаться. Причем это уменьшение будет последовательным от начала культивирования (лаг-фаза) до фазы отмирания.

Совсем иная картина будет наблюдаться при вмешательстве экспериментатора в процессы роста в любой фазе развития периодической культуры, например, разбавление 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. 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.

Управляемая культура 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, определяемые внешними условиями и предельными видоспецифическими характеристиками роста микроводорослей.

Квазинепрерывная культура. Если непрерывный рост клеток обеспечивается периодическим разбавлением культуры питательной средой, то такой режим выращивания называют квазинепрерывной проточной культурой. Фактически квазинепрерывная культура включает весь диапазон управляемых культур: от периодической до полностью непрерывной. Существенную роль в динамике плотности квазинепрерывной культуры играет величина относительного разбавления культуры. Эту величину количественно можно оценивать с помощью коэффициента разбавления (разведения, θ):

$$\theta = \frac{\bar{B}_k}{B_k},$$

где \bar{B}_k – плотность культуры до разбавления, B_k – плотность культуры после разбавления, k – порядковый номер разбавления.

Коэффициент разбавления показывает, во сколько раз разбавлена культура, и может изменяться от 1 (разбавления нет) до бесконечности (культура после разбавления имеет нулевую плотность). Варьируя величину коэффициента разбавления можно уменьшить плотность культуры до заданного уровня. Для разбавления культуры до необходимой плотности необходимо от общего (W_0) объема суспензии микроводорослей в культиваторе слить часть культуры объемом w и долить такой же объем питательной среды, т.е. коэффициент разбавления можно выразить через объем культиватора и объем слива:

$$\theta = \frac{W_0}{W_0 - w}.$$

Отсюда, если заданы коэффициент разбавления и общий объем культуры, можно найти объем слива (и долива):

$$w = W_0 - \frac{W_0}{\theta} = W_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) = W_0 \cdot \left(\frac{\theta - 1}{\theta}\right).$$

Разделив объем долива питательной среды на период времени между разбавлениями (Δt) и нормируя относительно объема культуры, получим удельную скорость потока среды (ω):

$$\omega = \frac{w}{W_0 \cdot \Delta t} = \frac{\theta - 1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}.$$

В промежутке между разбавлениями микроводоросли вырастут. За один промежуток времени между разбавлениями прирост плотности составит:

$$\bar{B}_{k+1} - \underline{B}_k = \bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k,$$

а относительная скорость прироста (скорость, нормированная относительно \bar{B}_k):

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k}{\Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}.$$

Здесь необходимо отметить, что нормировка скорости прироста плотности относительно величины плотности в момент предыдущего разбавления условна и выбрана для удобства.

После разбавления плотность культуры уменьшится на величину:

$$\bar{B}_k - \underline{B}_k = \bar{B}_k - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k = \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) \cdot \bar{B}_k.$$

Разность составит:

$$\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k - \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) \cdot \bar{B}_k = \bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k.$$

Скорость изменения этой разности, нормированная относительно \bar{B}_k , будет равна:

$$\frac{\bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} + \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} = \bar{\mu} - \omega.$$

Разность прироста и уменьшения плотностей при разбавлении может быть как положительной, так и отрицательной. Если относительная скорость прироста между разбавлениями выше удельной скорости разбавления, то разность будет положительной и перед каждым следующим разбавлением плотность культуры будет выше, чем перед предыдущим, т.е. плотность культуры со временем будет возрастать. Если скорость разбавления будет выше скорости прироста, то плотность культуры будет с течением времени падать.

Таким образом, показано, что динамика плотности квазинепрерывной культуры микроводорослей зависит от соотношения скорости роста культуры и протока среды. При равенстве скоростей плотность культуры изменяться не будет, т.е. наступит динамическое равновесие (или стационарный режим):

$$\bar{B}_{k+1} = \bar{B}_k = B^{st}.$$

Управление культурой может осуществляться различными способами: либо скорость протока регулируется в зависимости от скорости роста культуры, либо удельная скорость протока задается постоянной. В любом случае удельная скорость протока определяется двумя характеристиками: коэффициентом разбавления и периодом времени между разбавлениями. При этом возникает вопрос о выборе конкретных значений величины удельной скорости протока, которые должны быть в пределах значений удельной скорости роста микроводорослей. Эти пределы определяются видоспецифическими характеристиками роста микроводорослей в данных условиях выращивания: условия освещения, температура, питательная среда, газовая среда, перемешивание и др. Наиболее простой способ оценки характеристик роста – снятие накопительной кривой роста в конкретном культиваторе, которая позволит выбрать пределы, в которых возможно задавать величину плотности и удельной скорости протока.

Рассмотрим динамику плотности культуры в зависимости от способа управления квазинепрерывной проточной культурой.

Культура с заданной скоростью разбавления. Допустим, произведена оценка характеристик роста периодической культуры микроводорослей в данных условиях, при этом получена динамика роста, показанная штриховой линией на рис. 1. Выберем на кривой роста время начала разбавления для I варианта – 12, и для II варианта – 5,5.

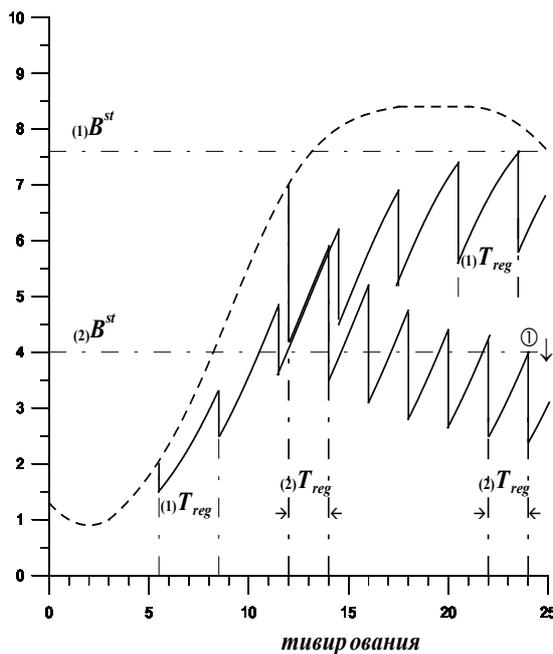


Рисунок 1. Динамика плотности квазинепрерывной культуры микроводорослей с заданным протоком среды. ① - вариант 1, ② - вариант 2. Коэффициенты разбавления: ${}_1\theta_{reg} = 1/0,6$; ${}_2\theta_{reg} = 4/3$. Периоды: ${}_1T_{reg} = 3$; ${}_2T_{reg} = 2$.

Figure 1. Dynamics of density of semi-continuous culture of microalgae are with the given duct of medium. - version 1, - version 2. Dilution coefficients: ${}_1\theta_{reg} = 1/0,6$; ${}_2\theta_{reg} = 4/3$. The terms: ${}_1T_{reg} = 3$; ${}_2T_{reg} = 2$.

Оценим относительные скорости прироста плотности в этих точках. Для I варианта плотность в начале разбавления, в момент времени 12, составляет около 7, а в момент времени 10 плотность была около 5,6, т. е. продуктивность на этом линейном участке роста равна 0,7, а относительная скорость прироста для плотности 7 равна 0,1. Для II варианта в начале разбавления, в момент времени 5,5, плотность примерно равна 2, а для момента времени 2,5 - около 1. Относительная скорость прироста на этом логарифмическом участке примерно равна 0,17, но удельная скорость роста, вычисленная для логарифмической фазы через логарифмы плотностей равна примерно 0,23.

Зададим условия квазинепрерывного процесса: в I варианте будем сливать 25 %

суспензии микроводорослей через каждые 3 единицы времени, во II - 40 % культуры через каждые 2 единицы времени, доливая в каждом случае соответствующий объем питательной среды. Фиксированные коэффициенты разбавления θ и время (T_{reg}) между периодическими разбавлениями культуры будут:

$${}_1\theta_{reg} = 1/0,6; {}_1T_{reg} = 3;$$

$${}_2\theta_{reg} = 1/0,75; {}_2T_{reg} = 2.$$

Относительные скорости прироста и заданные удельные скорости протока среды:

$$\bar{\mu}_1 = 0,1 < \omega_1 = 0,4/2 = 0,2;$$

$$\bar{\mu}_2 = 0,23 > \omega_2 = 0,25/3 \approx 0,08.$$

В I варианте удельная скорость протока среды выше относительной скорости прироста плотности, поэтому плотность культуры с увеличением числа разбавлений будет уменьшаться, пока относительная скорость прироста не достигнет уровня удельной скорости протока (0,2), и наступит стационарный рост культуры. Причем стационарная плотность должна быть близкой к начальной точке II варианта, где относительная скорость прироста равна 0,23. Во II варианте, наоборот, удельная скорость протока среды ниже относительной скорости прироста плотности, поэтому плотность культуры с увеличением числа разбавлений будет увеличиваться, пока относительная скорость прироста не снизится до уровня удельной скорости протока (0,08), и наступит стационарный рост культуры. В этом случае стационарная плотность должна быть близкой к начальной точке I варианта, где относительная скорость прироста равна 0,1. Наглядно динамика плотности культуры для этих двух вариантов показана на рис. 1.

Впервые метод выращивания морских микроводорослей в квазинепрерывной проточной культуре осуществили Кетчум и Редфилд в 1938 г., которые поддерживали активный рост диатомовой водоросли *Nitzshia closterium* за счет слива определенной части суспензии и замены её таким же объемом питательной среды [11].

Хемостат. Если снижать промежуток времени между разбавлениями культуры, уменьшая при этом коэффициент разбавления так, чтобы не изменилась удельная скорость протока, то в пределе мы получим непрерывную культуру, получившую название хемостат. Впервые хемостат для микробиологических процессов был предложен и теоретически обоснован одновременно Моно [12] и Новиком и Сциллардом [14].

Хемостат представляет собой систему культивирования, включающую реактор, в который непрерывно подается питательная среда и из которого непрерывно отбирается культура. Скорости подачи среды и отбора культуры должны быть равны, что обеспечивает постоянство объема культуры.

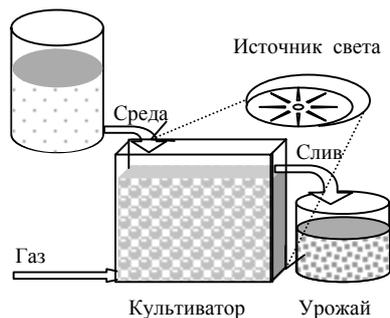


Рисунок 2. Система для хемостатных культур
Figure 2. System for hemostat cultures

Один из простейших вариантов хемостата с автоматическим поддержанием объема культуры в реакторе изображен на схеме. Культиватор для выращивания микроводорослей состоит из освещаемого реактора (фотореактор), который барботируется газо-воздушной смесью, содержащей углекислый газ. Барботаж обеспечивает перемешивание культуры, углеродное питание клеток и отвод кислорода. Из ёмкости с питательной средой, с постоянной заданной скоростью, в реактор поступает среда. Через отверстие в реакторе, расположенное на определенной высоте, культура непрерывно сливается в ёмкость для сбора урожая. Это обеспечивает при постоянной скорости

долива постоянство скорости слива и их равенство. Кроме того, такая система автоматически поддерживает постоянный объем культуры в фотореакторе.

Вернемся к формулам относительного прироста биомассы и удельной скорости протока среды для квазинепрерывного режима выращивания. Удельная скорость протока среды:

$$\omega = \frac{w}{W_0 \cdot \Delta t}.$$

В случае непрерывного протока среды, при скорости протока v , объем долива за промежуток времени Δt составит:

$$w = v \cdot \Delta t,$$

а удельная скорость протока будет равна:

$$\omega = \frac{v \cdot \Delta t}{W_0 \cdot \Delta t} = \frac{v}{W_0}.$$

Относительная скорость прироста биомассы в квазинепрерывной культуре:

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \frac{1}{\theta} \cdot \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t},$$

а для малых промежутков времени, при малых разбавлениях, разность в плотности между соседними разбавлениями будет также мала:

$$\Delta t \rightarrow 0, \theta \rightarrow 1, \bar{B}_k \rightarrow B$$

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{B}_{k+1} - \bar{B}_k}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} = \frac{\Delta B}{B \cdot \Delta t},$$

в пределе получим:

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \bar{\mu} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta B}{B \cdot \Delta t} = \frac{dB}{B \cdot dt} = \mu,$$

где B – текущая плотность культуры.

Т.е. с уменьшением коэффициента разбавления и периода между разведениями относительная скорость прироста биомассы в квазинепрерывной культуре будет приближаться к удельной скорости роста. В непрерывной проточной культуре они станут равными.

Непрерывность протока среды через фотореактор позволяет записать балансовое уравнение для динамики плотности непрерывной проточной культуры в дифференциальной форме:

$$\frac{dB}{dt} = \mu \cdot B - \omega \cdot B = (\mu - \omega) \cdot B.$$

Как видно из уравнения, динамика плотности непрерывной культуры зависит от удельной скорости роста, удельной скорости протока и плотности культуры. Но, удельная скорость роста, в свою очередь, зависит от внешних условий, в которых выращиваются клетки и плотности культуры. Зависимость удельной скорости роста от внешних условий представляет собой отдельную проблему, которая в данной работе не рассматривается.

Оценим рост культуры в хемостате для простых случаев, когда имеются некоторые стабильные характеристики роста, и нет необходимости построения сложных моделей. Примем, что у данного культиватора динамика роста биомассы в периодической культуре представляет собой кривую роста, изображенную на рис. 2. Время и биомасса выражены в условных единицах. Рост культуры в экспоненциальной фазе характеризуется постоянством удельной скорости роста, а рост на линейном участке – постоянством продуктивности.

Экспоненциальный рост микроводорослей для данной культуры наблюдается на участке времени от 3 до 7, т.е. в районе плотностей от 1 до 3. Этот участок с хорошей точностью описывается экспоненциальным уравнением роста:

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

$$B = 1 \cdot e^{0,278 \cdot (t - 3)}, 3 \leq t \leq 7.$$

здесь $t_{ln} = 3$ – момент времени начала логарифмической фазы роста; $B_{ln} = 1$ – плотность культуры в начале логарифмической фазы; $\mu_m = 0,278$ – максимальная удельная скорость культуры в данных условиях (для данного культиватора).

Участок накопительной кривой, рассчитанный по экспоненциальному уравнению роста после подстановки соответствующих величин, показан на рис. 2. Там же отмечены координаты начала и конца логарифмической фазы роста.

Плотность культуры в конце экспоненциальной фазы:

$$B^{ln} = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t^{ln} - t_{ln})} = 1 \cdot e^{0,278 \cdot (7 - 3)} \approx 3,$$

где $t^{ln} = 7$ – момент времени окончания логарифмической фазы.

Продуктивность в начале и конце фазы логарифмического роста:

$$P_{ln} = \mu_m \cdot B_{ln} = 0,278 \cdot 1 = 0,278,$$

$$P^{ln} = \mu_m \cdot B^{ln} = 0,278 \cdot 3 \approx 0,835.$$

Плотность культуры и продуктивность в начале линейного участка соответствуют плотности и продуктивности в конце экспоненциального участка:

$$B_l = B^{ln} = 3,$$

$$P_l = P^{ln} = \mu_m \cdot B_l = P_m = 0,278 \cdot 3 \approx 0,835.$$

здесь $P_m = 0,835$ – максимальная продуктивность культуры в данных условиях (для данного культиватора).

Подставляя эти результаты как коэффициенты в уравнение прямой, получим уравнение динамики плотности культуры в линейной фазе роста. Действительно, динамика плотности культуры на линейном участке роста с хорошей точностью описывается уравнением:

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l), t_l \leq t \leq t^l,$$

где $t_l = 7$ и $t^l = 11,5$ – моменты времени начала и окончания линейной фазы роста, соответственно.

Удельная скорость роста на линейном участке будет меняться, от максимальной в начале фазы, до минимальной в конце фазы. Уравнение для удельной скорости роста на этом участке имеет вид:

$$\mu = \frac{P_m}{B} = \frac{P_m}{B_l + P_m \cdot (t - t_l)},$$

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t - t_l)}, t_l \leq t \leq t^l.$$

На рис. 3 показана расчетная зависимость для плотности культуры в линейной фазе роста и отмечены координаты начала и конца линейного участка накопительной кривой.

В начале линейной фазы удельная скорость роста будет равна:

$$\mu_l = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t_l - t_l)} = \mu_m = 0,278,$$

что практически совпадает с максимальной удельной скоростью роста, что и следовало ожидать.

Действительно, исходя из условия непрерывности роста, удельная скорость роста в начале линейной фазы должна быть равной скорости в конце логарифмической фазы:

$$\mu = \frac{P^{ln}}{B^{ln}} = \frac{\mu_m \cdot B^{ln}}{B^{ln}} = \mu_m.$$

В конце линейной фазы роста ($t^l = 11,5$) плотность культуры будет равна:

$$B^l = B_l + P_m \cdot (t^l - t_l) = 3 + 0,835 \cdot (11,5 - 7) \approx 6,76.$$

Удельная скорость роста в конце линейной фазы роста:

$$\mu^l = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t^l - t_l)} = \frac{0,278}{1 + 0,278 \cdot (11,5 - 7)} \approx 0,124.$$

Таким образом, определены характеристики роста микроводорослей в логарифмической и линейной фазах роста культуры. Применим эти характеристики для анализа динамики плотности культуры в хемостате.

При логарифмическом росте удельная скорость роста постоянна и не зависит от плотности культуры и дифференциальное уравнение для динамики плотности культуры можно проинтегрировать. Получим уравнение динамики в интегральной форме:

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} &= (\mu_m - \omega) \cdot B, \quad \frac{dB}{B} = (\mu_m - \omega) \cdot dt, \\ \int_{B_0}^B \frac{dB}{B} &= (\mu_m - \omega) \cdot \int_{t_0}^t dt, \\ \ln \frac{B}{B_0} &= (\mu_m - \omega) \cdot (t - t_0), \end{aligned}$$

где t_0 и B_0 - время и плотность культуры в момент включения протока, соответственно.

Или:

$$B = B_0 \cdot e^{(\mu_m - \omega)(t - t_0)}.$$

Максимальная удельная скорость роста является предельной для удельной скорости протока, т.е. область работы хемостата ограничена:

$$\omega \leq \mu_m.$$

Это видно из уравнения динамики плотности: при $\omega > \mu_m$, показатель экспоненты будет отрицательным, и плотность культуры будет со временем уменьшаться до нуля, произойдет вымывание культуры. Причем скорость вымывания культуры будет тем выше, чем выше скорость протока. Два таких случая ($\omega > \mu_m$, $\omega \gg \mu_m$) показаны на рис. 3.

При равенстве удельной скорости протока и максимальной удельной скорости роста:

$$B = B_0 \cdot e^{0 \cdot (t - t_0)} = B_0.$$

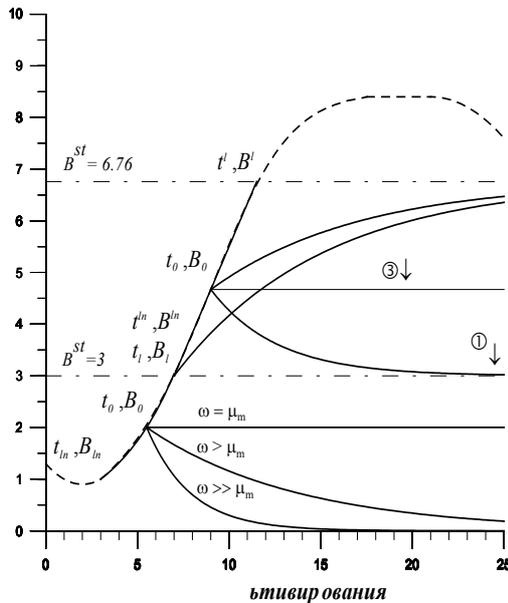


Рисунок 3. Динамика плотности культуры микроводорослей в хемостате (пояснения в тексте)
Figure 3. Dynamics of microalgae culture density in chemostat (explanations in the text)

Теоретически плотность культуры в этом случае будет постоянной, равной начальной плотности в момент включения протока и не должна изменяться со временем. В реальности такой процесс получить очень сложно, т.к. любое случайное изменение плотности приведет к новому стационарному состоянию. Процесс в этом случае будет неустойчивым. Пример стационарного состояния ($\omega = \mu_m$) для логарифмического роста показан на рис. 2.

При удельной скорости протока ниже максимальной удельной скорости роста динамику плотности нельзя описать полученным ранее интегральным уравнением, т.к. удельная скорость роста будет зависеть от плотности культуры. Допустим, удельная скорость протока задается в пределах удельных скоростей для линейного роста, тогда в дифференциальном уравнении динамики плотности удельную скорость роста можно выразить через плотность культуры, что приведет к другому уравнению динамики плотности:

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{P_m}{B}, \\ \frac{dB}{dt} &= (\mu - \omega) \cdot B, \\ \frac{dB}{dt} &= \left(\frac{P_m}{B} - \omega\right) \cdot B = P_m - \omega \cdot B = \mu_m \cdot B_l - \omega \cdot B.\end{aligned}$$

Разделив переменные и задавая начальные условия, можно найти интегральное выражение для динамики плотности культуры в хемостате (в рамках линейного роста):

$$\begin{aligned}\frac{dB}{P_m - \omega \cdot B} &= dt, \int_{B_0}^B \frac{dB}{P_m - \omega \cdot B} = \int_{t_0}^t dt, \\ -\frac{1}{\omega} \cdot \ln \frac{P_m - \omega \cdot B}{P_m - \omega \cdot B_0} &= (t - t_0), \ln \frac{P_m - \omega \cdot B}{P_m - \omega \cdot B_0} = -\omega \cdot (t - t_0).\end{aligned}$$

где B_0 – плотность культуры в момент времени включения протока t_0 .

Или:

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0\right) \cdot e^{-\omega(t-t_0)}$$

Важнейшим свойством полученной функции является то, что она имеет предел при $t \rightarrow \infty$. На практике это означает, что плотность культуры со временем не будет изменяться и иметь стационарное значение:

$$B^{st} = \lim_{t \rightarrow \infty} B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0\right) \cdot e^{-\omega(t-t_0)} = \frac{P_m}{\omega}.$$

Из полученного уравнения следует, что конечное стационарное состояние не зависит от предыстории культуры (t_0, B_0), и определяется только максимальной продуктивностью культуры и удельной скоростью протока среды. Стационарный процесс представляет собой динамическое равновесие между ростом культуры и её выносом с протоком. Причем динамическое равновесие устойчиво, т.к. конечное состояние не зависит от начальной плотности и случайное отклонение от стационарного состояния по плотности приведет к переходному процессу, заданному формулой динамики плотности, а в итоге плотность возвратится к тому же стационарному состоянию. Это утверждение справедливо для данной формулы, относящейся к линейному участку роста. Определим пределы для удельных скоростей протока, при которых будет наблюдаться устойчивое стационарное состояние.

Верхний предел удельной скорости протока определяется максимальной удельной скоростью роста μ_m , которая равна удельной скорости роста в начале линейной фазы. Однако отметим, что при удельной скорости протока, равной максимальной удельной скорости роста, стационарное состояние неустойчиво. Случайное отклонение плотности в сторону уменьшения, приведет культуру в область логарифмического роста. Как следует из формулы динамики плотности для этой области, плотность с течением времени не вернется к исходному состоянию, кроме того, процесс будет неустойчивым. Справедливость формулы для динамики плотности в хемостате на линейном участке роста, можно считать ограниченной величинами удельной скорости протока, которые ниже максимальной удельной скорости роста, и обеспечивающими устойчивый рост ($\omega < \mu_m$).

В конце линейной фазы ($t^l = 11,5$) удельная скорость роста:

$$\mu^l = \frac{\mu_m}{1 + \mu_m \cdot (t^l - t_l)} = \frac{0,278}{1 + 0,278 \cdot (11,5 - 7)} \approx 0,124.$$

т.е. удельная скорость протока для линейного роста может задаваться в пределах:

$$0,124 = \mu^l \leq \omega < \mu_m = 0,278.$$

Рассмотрим динамику плотности культуры в хемостате в пределах линейного роста на конкретных примерах. Допустим, в момент времени $t_0 = 9$ периодической культуры, включается проток. Плотность культуры в этот момент составляет:

$$B_0 = B_l + P_m \cdot (t - t_l) = 3 + 0,835 \cdot (9 - 7) = 4,67,$$

а удельная скорость роста:

$$\mu_0 = \frac{P_m}{B_0} = \frac{0,835}{4,67} \approx 0,179.$$

Зададим 3 значения удельной скорости протока в пределах линейного роста культуры.

$$\omega = \mu_m = 0,278, \quad \omega = \mu^l = 0,124, \quad \omega = \mu_0 = 0,179.$$

Соответствующие уравнения динамики плотности культуры будут описывать переходной процесс от начала включения протока до выхода на стационарный уровень:

$$B = \frac{0,835}{0,278} - \left(\frac{0,835}{0,278} - 4,67 \right) \cdot e^{-0,278 \cdot (t-9)},$$

$$B = \frac{0,835}{0,124} - \left(\frac{0,835}{0,124} - 4,67 \right) \cdot e^{-0,124 \cdot (t-9)},$$

$$B = \frac{0,835}{0,179} - \left(\frac{0,835}{0,179} - 4,67 \right) \cdot e^{-0,179 \cdot (t-9)}.$$

После окончания переходного процесса культура будет иметь стационарные значения плотности:

$$B^{st} = \frac{P_m}{\mu_m} = 3,$$

$$B^{st} = \frac{P_m}{\mu^l} = 6,76,$$

$$B^{st} = \frac{P_m}{\mu_0} = 4,67.$$

Покажем независимость стационарной плотности от предыстории культуры на ещё одном примере. Включим проток в момент времени 7 при плотности культуры 3. Удельную скорость протока зададим равной $\mu^l = 0,124$. Тогда уравнение переходного процесса и величина стационарной плотности будут:

$$B = \frac{0,835}{0,124} - \left(\frac{0,835}{0,124} - 3 \right) \cdot e^{-0,124 \cdot (t-7)},$$

$$B^{st} = \frac{P_m}{\mu^l} = 6,76.$$

Как видно из уравнения переходного процесса, с течением времени стационарная плотность достигнет той же величины, что и в примере 2. Графически все 4 примера показаны на рис. 2, где номера кривых соответствуют номерам примеров.

Культура с заданной плотностью. Плотностат. Рассмотрим другой способ управления культурой, когда скорость протока регулируется в зависимости от скорости роста культуры. При этом удельную скорость протока необходимо регулировать таким образом, чтобы она всегда была равной удельной скорости роста:

$$\omega = \mu.$$

В квазинепрерывной культуре относительная скорость прироста:

$$\mu = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t},$$

а удельная скорость протока:

$$\omega = \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}.$$

Условие равенства скоростей будет выполняться в случае:

$$\omega = \mu,$$

$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t},$$

$$\bar{B}_{k+1} = \bar{B}_k = B^{reg}.$$

Последнее равенство означает, что плотность культуры в момент разбавления должна быть равной плотности культуры в предыдущий момент разбавления. Режим управления по удельной скорости роста можно осуществить, если моменты разбавления подбирать по заданной плотности культуры перед разбавлением (B_{reg}). Т.е. для такого режима необходимо постоянно контролировать плотность культуры.

Удельная скорость протока определяется двумя параметрами: коэффициентом разбавления и периодом времени между разбавлениями. Регулирование можно осуществить либо одним из этих параметров, либо двумя сразу. Последний вариант предполагает непрерывное слежение за скоростью роста культуры и регулирование протока по величине этой скорости. Такой режим управления получил название спидостат и в данной работе не рассматривается.

Другой вариант – когда промежуток времени между разбавлениями задан (T_{reg}), а коэффициент разбавления подбирается таким образом, чтобы плотность после разбавления достигла заданной величины (B_{reg}). Если плотность культуры перед разбавлением (B^{st}), то можно найти коэффициент разбавления для достижения заданной величины (B_{reg}):

$$\theta = \frac{B^{st}}{B_{reg}}.$$

В этом варианте коэффициент разбавления определяется величиной относительной скорости прироста и периодом времени между разбавлениями:

$$\mu = \frac{\bar{B}_{k+1}}{\bar{B}_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{B_{reg} \cdot \theta}{B_{reg} \cdot \theta \cdot T_{reg}} - \frac{1}{\theta \cdot T_{reg}} = \frac{1}{T_{reg}} - \frac{1}{\theta \cdot T_{reg}},$$

$$\theta = \frac{1}{1 - \mu \cdot T_{reg}}.$$

Плотность культуры перед разбавлением определяется начальной плотностью, относительной скоростью прироста и временем между разбавлениями:

$$B^{st} = \frac{B_{reg}}{1 - \mu \cdot T_{reg}}.$$

Преимуществом данного варианта управления является возможность дискретного измерения плотности, через заданный промежуток времени, а не постоянного контроля плотности культуры. На рис. 4 показан пример управления культурой по заданному периоду времени $T_{reg} = 1$ между измерениями плотности и разбавлением культуры до заданной плотности $B_{reg} = 6$.

В третьем варианте управления плотность культуры контролируется непрерывно в промежутке между разбавлениями. В момент достижения заданной плотности (B_{reg}), культуру разбавляют с заданным коэффициентом (θ_{reg}). Период времени между разбавлениями устанавливается автоматически, в зависимости от относительной скорости

прироста культуры. Этот период можно определить из уравнения для относительной скорости прироста культуры:

$$\mu = \frac{\overline{B}_{k+1}}{B_k \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{B^{reg}}{B^{reg} \cdot \Delta t} - \frac{1}{\theta_{reg} \cdot \Delta t} = \frac{1}{\Delta t} \cdot \frac{\theta_{reg} - 1}{\theta_{reg}},$$

$$\Delta t = \frac{1}{\mu} \cdot \frac{\theta_{reg} - 1}{\theta_{reg}}.$$

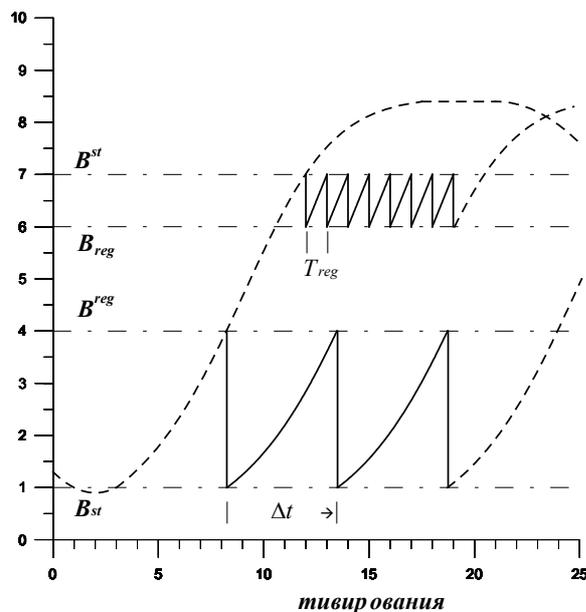


Рисунок 4. Динамика роста микроводорослей в квазипрерывной культуре с заданной плотностью: штриховыми линиями показан рост в периодической культуре (пояснения в тексте)

Figure 4. Dynamics of microalgae growth in quasycontinuous culture with the set density: Shaped lines show growth in periodic culture (explanations in the text)

Плотность культуры после разбавления:

$$B_{st} = \frac{B^{reg}}{\theta_{reg}}.$$

Наличие системы контроля плотности культуры позволяет подобрать такой режим выращивания микроводорослей, при котором плотность до и после разбавления сблизится практически до равного уровня. Для этого необходимо снизить коэффициент разбавления и время между разбавлениями до минимально возможных, которые определяются заданной точностью и техническими возможностями системы культивирования. В идеале можно получить непрерывный процесс роста микроводорослей с заданной стабильной плотностью, что позволяет описывать рост простыми дифференциальными уравнениями, аналогичными применяемым для хемостата.

Контроль плотности культуры в строго непрерывном режиме выращивания предполагает использование методов, которые не влияют на рост клеток. Наиболее подходящим можно считать оптический метод оценки плотности культуры. Способ управления ростом культуры при стабилизации оптической плотности на заданном уровне назван турбидостатом (турбидостатом) и впервые был использован для исследования роста микробных популяций [9, 10, 13].

Одним из принципиальных, и в тоже время очень важных, отличий хемостата и турбидостата является возможность получения в турбидостате устойчивого экспоненциального роста клеток микроводорослей без лимитирования элементами минерального питания (лимитированного только светом или потоком углекислого газа), что невозможно при хемостатном способе культивирования. Т.е. в турбидостате можно исследовать в чистом виде влияние главного фактора, определяющего рост микроводорослей – свето-

вые условия, в которых растут клетки. Эти световые условия складываются из внешнего фактора – облученности культуры, и внутреннего - оптических свойств самой культуры.

Существенным различием между оптическими свойствами обычной культуры микробов и микроводорослей является высокое содержание пигментов в микроводорослях, которые определяют их оптические свойства в видимой области. Если у неокрашенных микробных клеток оптическая плотность культуры линейно связана с концентрацией клеток и биомассы, то у микроводорослей оптические характеристики целиком определяются пигментами клеток, причем содержание пигментов в клетках варьирует в широких пределах. Поэтому контроль плотности культуры микроводорослей по оптическим характеристикам фактически означает контроль оптической плотности (или пигментного состава клеток), но не биомассы или концентрации клеток. В связи с этим режим управления культурой микроводорослей при заданной оптической плотности получил название плотностат [5].

Технически простейший плотностат отличается от хемостата только наличием датчика оптической плотности и исполнительного механизма (дозатора питательной среды), который включается при достижении культурой заданной плотности [4, 8]. Оптическая система позволяет поддерживать устойчивый режим при разности плотностей до и после разбавления на уровне ниже 1% от заданной плотности, что позволяет считать динамику плотности практически неизменной и пользоваться дифференциальными уравнениями для её формального описания.

Оба варианта управления с заданной оптической плотностью культуры успешно применяются при исследовании ростовых, продукционных и фотоэнергетических характеристик микроводорослей [1, 2]. Такой метод особенно полезен при изучении субстрат-зависимого роста, т.к. стабилизация оптической плотности позволяет проводить исследование при неизменных световых условиях. Это дает возможность строго контролировать влияние на рост других факторов среды и выделить факторы, даже незначительно влияющие на рост, например, при оптимизации микроэлементного состава питательной среды для морских микроводорослей [3, 6, 7].

1. *Белянин В. Н.* Светозависимый рост низших фототрофов. – Новосибирск: Наука, 1984. – 96. – С. 96.
2. *Белянин В. Н., Сидько Ф. Я., Тренкену А. П.* Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. – 1980. – Новосибирск: Наука. – 136 с.
3. *Белянин В. Н., Тренкену Р. П., Силкин В. А.* Рост водоросли *Platymonas viridis* в опытах по оптимизации микроэлементного состава среды // Биология моря. – 1979. - № 4. - С. 14 - 19.
4. *Ковров Б. Г., Буданов А. С.* Малый лабораторный культиватор для интенсивного выращивания хлореллы в управляемых условиях среды // Управляемое культивирование микроводорослей. - М.: Наука. - 1964. - С. 8 - 12.
5. *Терсков И. А., Гительзон И. И., Сидько Ф. Я.* и др. Интенсивное непрерывное культивирование хлореллы в плотностном режиме при различной освещенности // Управляемое культивирование микроводорослей. - 1964. - М: Наука. - С. 55 - 84.
6. *Тренкену Р. П., Белянин В. Н.* Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* // Экология моря. - 1980. - Вып. 1.
7. *Тренкену Р. П., Белянин В. Н.* О влиянии соотношений концентраций марганца и других микроэлементов на рост морской микроводоросли. // Параметрическое управление биосинтезом микроводорослей. - Новосибирск: Наука, 1980. - С. 5 - 8.
8. *Штоль А. А., Мельников Е. С., Ковров Б. Г.* Расчет и конструирование культиваторов для одноклеточных водорослей. – Красноярск: Красноярское книжное изд-во, 1976. – 96 с.
9. *Anderson P. A.* Automatic recording of the growth rates of continuously cultured microorganisms. // J. General Physiol. – 1953. – 36. - P. 733 - 739.
10. *Bryson V.* Microbial selection. The turbidostatic selector – a device for automatic isolation of bacterial variants // Science. – 1952. - 117. - P. 48 - 52.
11. *Ketchum B. H., Redfield A. C.* A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. // Biol. Bull. - 1938. - 75. - P. 165 - 169.

12. *Monod J.* La technique de culture continue. Theorie et applications. // Ann. Inst. Pasteur. – 1950. – **79.** – P. 390 - 410.
13. *Northrop I. H.* Apparatus for maintaining bacterial cultures in the steady state. // – J. of General Physiol. – 1954. – **38.** - P. 105 - 110.
14. *Novick A., Szilard L.* Description of the chemostat. // Science. – 1950. – **112.** – P. 715 - 718.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 05.05.2005

R. P. T R E N K E N S H U

SIMPLEST MODELS OF MICROALGAE GROWTH

2. QUEASYCONTINUOUS CULTURE

Summary

The description models of growth quasycontinuous cultures of microalgae are offered. Management of growth can be carried out on density of culture and time dilution.