

ПРОСТЕЙШИЕ МОДЕЛИ РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

1. ПЕРИОДИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА

Предложены простейшие математические модели для описания различных фаз роста микроводорослей в периодической культуре. Кинетические характеристики роста – удельная скорость и продуктивность – выражены через плотность культуры в начале или конце фазы роста. Константами уравнений служат максимальные значения удельной скорости роста, продуктивности и удельной скорости темнового дыхания. Полученные уравнения позволяют количественно описать динамику роста и развития микроводорослей при периодическом (накопительном) способе выращивания клеток. Если в опытах измеряются биохимические показатели, то полученные уравнения можно применить для описания динамики исследуемых компонентов клеток и найти соотношение кинетических характеристик.

Количество исследований роста и биохимического состава микроводорослей в культуре огромно и составляет тысячи опубликованных экспериментальных работ. Большинство опытов проведено с периодической культурой микроводорослей и практически без использования математического анализа данных с помощью даже простейших моделей роста. В лучшем случае анализ сводится к определению удельной скорости роста через логарифмирование концентрации клеток. Хотя такое представление об измерении удельной скорости роста применимо в ограниченном диапазоне концентраций клеток при соблюдении некоторых условий, которые в большинстве такого рода работ не соблюдаются.

Сложившаяся традиция работы с периодической культурой без серьезного анализа полученных данных связана, в первую очередь, с простотой и небольшой трудоемкостью проведения таких экспериментов. Проблема заключается в том, что рост микроводорослей в периодической культуре представляет собой неравновесный динамический процесс, а исследования проводятся, как правило, специалистами без соответствующей математической подготовки и им трудно анализировать такие процессы. Еще одной проблемой является отсутствие простой, но общепринятой модели субстратзависимого роста микроводорослей, хотя предложено их большое количество, особенно моделей светозависимого роста.

Несмотря на относительно небольшое число экспериментальных работ с непрерывными культурами микроводорослей, основные успехи в области изучения роста микроводорослей достигнуты именно при работе в таких режимах выращивания. Особенностью непрерывных культур является возможность достижения динамически равновесного состояния. В этом случае стабилизируются все характеристики культуры, строго контролируется воспроизводимость результатов, любой анализ производится без вмешательства в процессы роста. Здесь появляется возможность определения скоростей роста с любой заданной точностью, а выполняющееся условие – все удельные скорости равны и равны удельной скорости потока – позволяет находить зависимости биохимического состава клеток от условий внешней среды. Кроме того, значительно упрощается математический аппарат при анализе данных.

Более сложная ситуация наблюдается в периодической культуре микроводорослей, когда вмешательство в процессы роста нежелательно, но без отбора проб невозможен анализ состояния культуры и приходится искать компромисс, который каждый исследователь находит произвольно. Это приводит к ограничению сопоставимости результатов. Однако, есть возможность избежать противоречия, применив режим многоступенчатого культивирования, например, используя многоступенчатый хемостат. В этом случае можно с заданной точностью промоделировать всю накопительную кривую роста микроводорослей.

Несмотря на небольшие технические трудности, такие работы практически отсутствуют. Причина здесь также кроется в отсутствии пусть простейших, но общепринятых модельных представлений о росте микроводорослей в культуре.

В первой части нашей работы предлагаются простейшие модели роста микроводорослей для различных фаз периодической культуры.

Кинетические характеристики роста. Основной кинетической характеристикой роста микроводорослей является скорость роста, которая определяется процессами фотобиосинтеза и зависит от скорости синтеза биомассы. Однако, рассматривая рост в общем случае, необходимо учитывать процессы, происходящие в клетке, напрямую не связанные с синтезом. К таким процессам относится механизм поддержания структуры клетки. Этот механизм у микроводорослей малоизучен. Известно, что при низких интенсивностях света в клетках явно наблюдается так называемое «темновое» дыхание, сопровождающееся поглощением кислорода и уменьшением биомассы клеток. Выделение кислорода и рост микроводорослей начинается только после увеличения интенсивности света выше некоторой величины (соответствующей компенсационному пункту фотосинтеза), при которой скорости выделения и поглощения кислорода равны.

В общем случае, рост и биосинтез компонентов клетки является результатом двух процессов: собственно фотосинтеза и дыхания. Расходы на дыхание, связанные с ростом (фотодыхание) пропорциональны «чистому» фотосинтезу, их трудно вычленишь 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.

Синтезированная в процессе роста биомасса (B) может быть представлена как сумма её биохимических составляющих:

$$B = \sum_{k=1}^{k=n} B_k,$$

где B_k – масса k -го компонента; k – номер составляющих, $k=1, 2 \dots n$; n – общее количество биохимических составляющих.

Содержание данного компонента в биомассе может быть выражено в относительных единицах:

$$\beta_k = \frac{B_k}{B} = \frac{B_k}{\sum_{k=1}^{k=n} B_k}.$$

Скорость синтеза биомассы (P_0) будет равна сумме скоростей синтеза всех биохимических составляющих (P_0^k):

$$P_0 = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 = \sum_{k=1}^{k=n} P_0^k = \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB^k}{dt}.$$

Скорость темнового дыхания (P_r), связанного с расходами на поддержание структуры, считают пропорциональным биомассе:

$$P_r = \sum_{k=1}^{k=n} \mu_r^k \cdot B_k \cong \mu_r \cdot B,$$

где μ_r – удельная скорость темнового дыхания (или расхода биомассы на поддержание структуры); μ_r^k – удельная скорость расхода данного компонента биомассы на поддержание структуры.

Скорость роста (или наблюдаемая скорость синтеза биомассы), P , будет равна разности скоростей «чистого» фотобиосинтеза и потерь на дыхание:

$$P = P_0 - P_r,$$

$$P = \frac{dB}{dt} = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r \cdot B.$$

Аналогично, с учетом расхода на дыхание, можно наблюдаемую скорость синтеза данного компонента (P_k) представить как разность скорости синтеза (P_k^0) и скорости потерь данного компонента при дыхании (P_k^r):

$$P_k = P_k^0 - P_k^r,$$

или

$$P_k = \frac{dB_k}{dt} = P_k^0 - \mu_k^r \cdot B_k.$$

Запишем уравнение скорости роста в виде:

$$P = \frac{dB}{dt} = P_0 - P_r = \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB_0^k}{dt} - \sum_{k=1}^{k=n} \mu_r^k \cdot B_k = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r \cdot B.$$

Величина скорости, как характеристика роста, не всегда удобна для сравнительных оценок, т.к. её значение зависит от количества растущей биомассы. Этого недостатка лишена другая характеристика роста – удельная скорость роста (μ). Удельная скорость роста растений по Блэкману [2] представляет собой величину скорости роста, нормированную относительно биомассы. Т.е. удельная скорость роста показывает, сколько единиц биомассы синтезирует каждая единица биомассы в единицу времени:

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

или

$$\mu = \frac{P}{B} = \frac{P_0}{B} - \frac{P_r}{B} = \frac{1}{B} \cdot \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB_0^k}{dt} - \frac{1}{B} \cdot \sum_{k=1}^{k=n} \mu_r^k \cdot B_k = \frac{1}{B} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r.$$

Обозначим удельную скорость синтеза биомассы через (μ_0):

$$\mu_0 = \frac{1}{B} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)_0,$$

тогда

$$\mu = \mu_0 - \mu_r.$$

Рассмотрим случай неограниченного роста биомассы, при условии, что удельная скорость роста не изменяется с течением времени t , т.е. $\mu = \text{const}$. Общее количество биомассы можно определить исходя из уравнения удельной скорости роста (по определению):

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

Разделив переменные, задав начальные условия (в момент времени $t_0 = 0$, биомасса равна B_0) и интегрируя, получим формулу динамики роста биомассы:

$$\int_{B_0}^B \frac{dB}{B} = \mu \cdot \int_0^t dt,$$

$$\ln \frac{B}{B_0} = \mu \cdot t,$$

$$B = B_0 \cdot \exp^{\mu \cdot t}.$$

Формула применима для ограниченных промежутков времени при изучении глобальных процессов фотобиосинтеза. Для микроводорослей применение этой формулы также ограничено, т.к. биомасса одной клетки не может быть выше некоторой величины, при достижении которой клетка делится. Однако общую биомассу можно представить как сумму масс отдельных клеток:

$$B = \sum_{k=1}^{k=n} b_k,$$

где b_k – масса k -й клетки; k – номер клетки, $k=1, 2 \dots n$; n – общее количество клеток.

Несмотря на очевидную простоту этой связи, она весьма полезна в математическом отношении, т.к. появляется возможность оперирования непрерывными величинами (биомасса) вместо дискретных (число клеток). Особенно это важно для небольшого числа клеток, т.к. в реальности мы имеем дело с ограниченными объемами, в которых растут микроводоросли.

Рассмотрим культуру микроводорослей как популяцию, состоящую из большого числа клеток. Принимая, что прирост числа клеток dn за бесконечно малый промежуток времени dt , пропорционален числу клеток n , можно записать дифференциальное уравнение:

$$\frac{dn}{dt} = \mu \cdot n.$$

Здесь μ – константа роста. Эту константу называют удельной скоростью размножения, темпом деления клеток, удельной скоростью деления, константой размножения и т.д.

Если промежуток времени между делениями клеток (время генерации) обозначить через g_d , а клетка делится на d дочерних клеток, то константа роста:

$$\mu = \frac{\ln d}{g_d}.$$

В случае деления клетки на две дочерних:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g_2}.$$

Из этого выражения находим время удвоения биомассы (при любом числе дочерних клеток), которое численно равно времени генерации для клеток делящихся на две части:

$$g_2 = \frac{\ln 2}{\mu}.$$

Если возрастная структура популяции не изменяется в течение некоторого времени, а следовательно, не изменяется и средняя масса клетки ($\bar{b}$), то константа роста на этом промежутке времени равна удельной скорости роста (по биомассе):

$$\mu = \frac{dn}{n \cdot dt} = \frac{\bar{b} \cdot dn}{\bar{b} \cdot n \cdot dt} = \frac{dB}{B \cdot dt}.$$

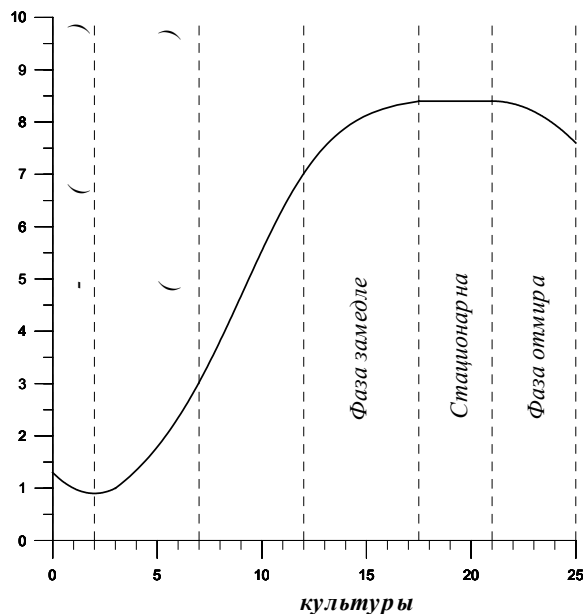
Эта формула показывает эквивалентность кинетической характеристики роста биомассы микроводорослей и популяционной характеристики их роста.

В дальнейшем вместо числа клеток n и биомассы B , будем использовать их объёмные или поверхностные концентрации. В случае выращивания микроводорослей используют термин плотность культуры, который эквивалентен понятию концентрации клеток или биомассы.

Таким образом, в качестве характеристики роста микроводорослей можно использовать величины скорости роста (= абсолютная, валовая скорость или продуктивность) и удельной скорости роста.

Периодическая культура. В реальности рост микроводорослей всегда ограничен. Особенно наглядно это проявляется при искусственном выращивании микроводорослей. Существует два основных способа культивирования клеток: накопительная (периодическая) и непрерывная культура, которые являются крайними случаями всех возможных режимов выращивания микроводорослей.

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



ми 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. Типичный график изменения плотности культуры микроводорослей в зависимости от времени выращивания (возраст культуры) представлен на рис. 1.

Рисунок 1. Динамика накопления биомассы или концентрации клеток в периодической культуре микроводорослей. Штриховыми линиями обозначены условные границы между фазами роста культуры

Figure 1. Dynamics of accumulation of biomass or cells concentration in batch culture of microalgae. Dashed lines designate conditional borders between growth phases of culture

В целом динамика роста периодической культуры микроводорослей аналогична накопительным кривым любых других микробиологических культур [5]. Накопительная кривая культуры микроводорослей условно разделена на несколько периодов (фаз) роста, характеризующихся определенными величинами кинетических параметров.

Лag-фаза. Как правило, для первоначального 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.

Логарифмическая (лог-фаза, экспоненциальная) фаза роста. 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 ($\mu_m = \text{const}$). Следовательно, для логарифмической фазы роста применима зависимость плотности культуры от времени, которую мы получили ранее для неограниченного роста биомассы:

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

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

где B_{ln} – биомасса в начале лог-фазы t_{ln} .

Такая двойка (логарифмическая и экспоненциальная) запись формулы динамики роста породила и двойное название этой фазы. Используя формулу связи биомассы

и числа клеток, можно записать выражения для динамики концентрации клеток в логарифмической фазе роста культуры:

$$\ln \frac{n}{n_{ln}} = \mu_m \cdot (t - t_{ln}),$$

$$n = n_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})}.$$

Последнее выражение полностью идентично закону Мальтуса для неограниченного роста популяций. В полулогарифмическом масштабе зависимость логарифма числа клеток от времени будет изображаться прямой. Тангенс угла наклона прямой к оси времени будет равен удельной скорости роста:

$$\mu_m = \frac{1}{t - t_{ln}} \cdot \ln \frac{n}{n_{ln}} = \frac{\ln n - \ln n_{ln}}{t - t_{ln}}.$$

Такой простой способ измерения удельной скорости роста микроводорослей часто используется в экспериментальных исследованиях. При этом почти всегда допускается ошибка, связанная с тем, что для определения скорости используют две экспериментальные точки, априори полагая постоянство удельной скорости роста на промежутке между точками. Опыт показывает, что длительный строго экспоненциальный рост микроводорослей наблюдается крайне редко. Однако, даже такие, ориентировочные оценки удельной скорости роста, часто важны для сравнительного анализа.

Фаза линейного роста. Практически всегда на кривой роста микроводорослей можно выделить прямолинейный участок. Это указывает на постоянство скорости роста (продуктивности культуры, $P = P_m = \text{const}$). Как правило, на линейном участке скорость роста определяется величиной внешнего потока (света или углекислого газа), который полностью поглощается культурой и ограничивает продуктивность культуры в целом. Такое объяснение вполне согласуется с известным представлением об оптимальных и лимитирующих факторах [3].

Уравнение роста для линейной фазы:

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

Здесь B_l - плотность культуры в момент начала линейной фазы t_l .

Из этого уравнения можно найти величину максимальной продуктивности, которая будет равна тангенсу угла наклона линейного участка кривой роста:

$$P_m = \frac{B - B_l}{t - t_l}.$$

С ростом плотности культуры удельная скорость роста будет уменьшаться обратно пропорционально плотности:

$$\mu = \frac{P_m}{B}.$$

Этот участок кривой роста позволяет довольно точно проследить изменение удельной скорости роста со временем:

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

Фаза замедления роста. 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 [1, 3], т.е. концентрация какого либо биогенного элемента в среде уменьшается до уровня, при котором скорость синтеза определяется уже данным элементом, согласно кинетике Михаелиса-Ментен или Моно [2, 4]. 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.

Для продуктивности на этом участке можно записать уравнение:

$$P = P_0 - \mu_r \cdot B.$$

Величину скорости синтеза P_0 можно оценить как сумму продуктивности и скорости дыхания в конце линейной фазы (при плотности культуры B^l):

$$P_0 = P_m + \mu_r \cdot B^l.$$

В этом случае продуктивность для фазы замедления роста:

$$P = P_m + \mu_r \cdot B^l - \mu_r \cdot B = P_m - \mu_r \cdot (B - B^l).$$

В конце фазы замедления плотность культуры достигнет максимального значения B_m , а скорость роста станет равной нулю, что позволяет оценить удельную скорость дыхания:

$$P = P_m - \mu_r \cdot (B_m - B^l) = 0,$$

$$\mu_r = \frac{P_m}{B_m - B^l}.$$

Уравнения для скоростей роста культуры в фазе замедления можно записать в виде:

$$\frac{dB}{dt} = P_m - \frac{P_m}{B_m - B^l} \cdot (B - B^l) = P_m \cdot \frac{B_m - B}{B_m - B^l},$$

$$\mu = \frac{P_m}{B} \cdot \frac{B_m - B}{B_m - B^l}.$$

Разделив переменные и задав начальные условия (момент времени начала фазы замедления совпадает с концом фазы линейного роста, t^l , и плотность в этот момент равна B^l), уравнение можно проинтегрировать:

$$\int_{B^l}^B \frac{dB}{B_m - B} = \frac{P_m}{B_m - B^l} \cdot \int_{t^l}^t dt,$$

$$\ln \frac{B_m - B^l}{B_m - B} = \mu_r \cdot (t - t^l).$$

Преобразовав полученное выражение, получим уравнение динамики плотности культуры:

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

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.

Фаза отмирания. В фазе отмирания наблюдается превалирование процессов дыхания над процессами синтеза. Скорости роста (отрицательные) будут равны скоростям распада:

$$\mu = -\mu_r,$$

$$P = \frac{dB}{dt} = -\mu_r \cdot B.$$

Интегрируя последнее выражение при начальных условиях (в начале фазы отмирания, которому соответствует момент времени конца стационарной фазы t^{st} , плотность культуры равна B_m), получим уравнение динамики плотности культуры в фазе отмирания:

$$\int_{B_m}^B \frac{dB}{B} = -\mu_r \cdot \int_{t^{st}}^t dt,$$

$$\ln \frac{B}{B_m} = -\mu_r \cdot (t - t^{st}),$$

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

В фазе отмирания происходят глубокие физиологические изменения клеток микроводорослей, вплоть до их гибели. Скорости роста становятся отрицательными, 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, т.е. в лаг-периоде будет также наблюдаться уменьшение биомассы. Этот процесс можно описать выражениями, аналогичными уравнениям для фазы отмирания:

$$\mu = -\mu_r,$$

$$P = \frac{dB}{dt} = -\mu_r \cdot B,$$

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

где B_0 – плотность культуры в момент времени внесения инокулята t_0 .

Заключение к первой части работы. В табл. 1 приведены простейшие уравнения роста для различных фаз развития периодической культуры микроводорослей. Несмотря на приближенный характер предложенных моделей, они могут быть использованы для сравнительной количественной оценки ростовых характеристик при изучении влияния факторов внешней среды на рост микроводорослей. 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.

Таблица 1. Уравнения для расчета ростовых показателей микроводорослей в различных фазах развития периодической культуры

Table 1. The equations for calculation of microalgae's growth parameters in various phases of development of batch culture

Фазы роста	Простейшие математические модели роста		
	Удельная скорость	Продуктивность	Динамика плотности
Лаг-период	$\mu = -\mu_r$	$P = -\mu_r \cdot B$	$B = B_0 \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t_0)}$
Логарифмическая	$\mu = \mu_m$	$P = \mu_m \cdot B$	$B = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})}$
Линейная	$\mu = P_m / B$	$P = P_m$	$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l)$
Замедления	$P = \mu_r \cdot (B_m - B) / B$	$P = \mu_r \cdot (B_m - B)$	$B = B_m - (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^l)}$
Стационарная	$\mu = 0$	$P = 0$	$B = B_m$
Отмирания	$\mu = -\mu_r$	$P = -\mu_r \cdot B$	$B = B_m \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^{st})}$

1. *Blackman F. F.* Optima and limiting factors // Ann. Bot. Lond. - 1905. - **19**. - P. 281 - 295.
2. *Blackman V.N.* The compound interest law and plant growth. // Ann. Bot. Lond. - 1919. - **33**. - P. 353 - 360.
3. *Liebig J.* Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology (1840). - 1847. - London: Taylor and Walton (4-th ed.). - 320 P.
4. *Michaelis L., Menten M. L.* Die Kinetik der Invertinwirkung // Biochem. J. - 1913. - **49**. - P. 333 - 343.
5. *Monod J.* The Growth of Bacterial Cultures // Ann. Rev. Microbiol. — 1949. - **3**. — P. 371 - 394.

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 **1. BATCH CULTURE**

Summary

Simplest mathematical models for exposition of various growth phases of microalgae in batch culture are offered. Kinetic performances of microalgae growth - specific rate and productivity - are expressed through density of culture in the beginning or the end of growth phase. Constants of equations peak are values of specific growth rate, productivity and specific rate of dark respiration. The obtained equations allow describing quantitatively the dynamics of microalgae growth and development at batch (accumulative) method of cells cultivation. If the biochemical parameters are changed in experience the obtained equations can apply to exposition of dynamics of explored cells ingredients and to find an interrelation of kinetic performances.