

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт морских биологических исследований
им. А. О. Ковалевского

Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н.,
Никонова Л. Л., Бобко Н. И., Нехорошев М. В.

**ОЦЕНКА ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ ФОТОТРОФНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ЙОДАТНОЙ
ОКИСЛЯЕМОСТИ**

Севастополь, 2015

УДК 582:261.1:57.083.1

ББК 28.591.2

Г–27

Р е ц е н з е н т:

Ревина А. А., доктор химических наук, профессор, Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН

Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Никонова Л. Л., Бобко Н. И., Нехорошев М. В. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости. — Севастополь, 2015. — 31 с.

Разработан простой метод оценки плотности культуры фототрофных микроорганизмов на основе окисляемости биомассы йодатом калия в серной кислоте. Йодат в серной кислоте позволяет достичь полного окисления до двуокиси углерода практически любых органических соединений природного происхождения, включая предельные углеводороды и органические кислоты. Предложенный метод основан на двух процессах: 1) на окислении биомассы с образованием устойчивого соединения $(\text{IO})_2\text{SO}_4$ (дийодозилсульфат); 2) на разложении $(\text{IO})_2\text{SO}_4$ с выделением йода. Показано, что при окислении биомассы микроорганизмов отношение массы выделившегося йода к массе затраченного кислорода близко к 3,17. Экспериментально установлена линейная зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе от плотности культур представителей различных систематических групп фототрофных микроорганизмов (цианобактерий, диатомей, красных и зелёных микроводорослей).

Адресовано альгологам, микробиологам, биотехнологам, а также исследователям смежных специальностей.

Ключевые слова: цианобактерии, микроводоросли, биомасса, бихроматная окисляемость, перманганатная окисляемость, *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl., *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross.

© Р. Г. Геворгиз, С. Н. Железнова, Л. Л. Никонова,
Н. И. Бобко, М. В. Нехорошев, 2015

© ФБГУН ИМБИ, 2015

Введение

Широкое применение культур фототрофных микроорганизмов (ФМ) в научных и производственных процессах обусловлено их уникальными свойствами. Благодаря чрезвычайному видовому разнообразию, высокой удельной скорости роста и пластичности метаболизма, культуры ФМ являются неотъемлемой частью фундаментальных исследований в микробиологии, физиологии, биохимии, гидроэкологии, биофизике и других науках. Кроме того, разнообразие химического состава клеток, способность синтезировать целый ряд ценных веществ, а также способность ассимилировать органические и неорганические соединения из среды обитания позволяют активно использовать культуры ФМ в различных сферах современной биотехнологии.

На сегодняшний день в литературе представлено множество публикаций, посвящённых оценке качественных и количественных характеристик культур ФМ. Ключевым параметром во многих исследованиях является плотность культуры (биомасса), которая обычно представляется совокупностью клеток или их массы в единице объёма. Для определения плотности культуры используют метод прямого подсчёта числа клеток в суспензии или гравиметрическое определение сухого вещества в единице объёма [1, 2]. В зависимости от физических свойств суспензии, а также физиологических особенностей клеток, на практике для определения плотности культуры широко используются косвенные методы. Например, оптические методы основаны на ослаблении [3], рассеянии [4] или переизлучении [5] светового потока, оригинальный метод Филипповского Ю. Н. основан на изменении температуры культуры [6], метод центрифужных объёмов основан на определении объёма, занимаемого клетками в суспензии [7] и пр. В гидробиологической практике также используется метод мокрого сжигания [1, 8, 9], который основан на окисляемости органического вещества [10, 11], при этом в качестве окислителя используются перманганат калия [12], бихромат калия [13], йодат калия [14], соли церия (IV) и др.

Для мокрого сжигания водных организмов наибольшее распространение получили методы, основанные на бихроматном и йодатном окислении в серной кислоте [8, 14–16]. Принято считать, что эти методы характеризуются одинаковой полнотой окисления (~90%), но метод бихроматного окисления более удобен при работе с большими сериями проб, т. к. более прост и требует меньших затрат времени [8].

Отметим одно важное обстоятельство. Раствор йодата калия в концентрированной серной кислоте характеризуется следующими особенностями [17, 18]:

1. В отсутствие органических веществ (восстановителей) смесь практически не разлагается при температуре 200 °С (разлагается всего 0,1-0,2%).
2. При температуре 195 °С смесь полностью окисляет практически все органические вещества. Исключение составляют мочевины, фосген, четырёххлористый углерод и некоторые гетероциклические соединения азота.
3. В отличие от реакций, где используют другие окислители, окисление йодатом в серной кислоте идёт полностью до двуокиси углерода. Окись углерода совершенно не образуется. Повышение температуры до 220 °С позволяет достичь практически полного окисления даже таких трудно окисляемых веществ природного происхождения, как предельные углеводороды и органические кислоты [11, 17].
4. Также важно отметить, что в ходе реакции не образуется осадок.

В отличие от йодата калия бихромат калия в концентрированной серной кислоте начинает разлагаться уже при температуре 150 °С (см. рисунок 1), при этом полного окисления органического

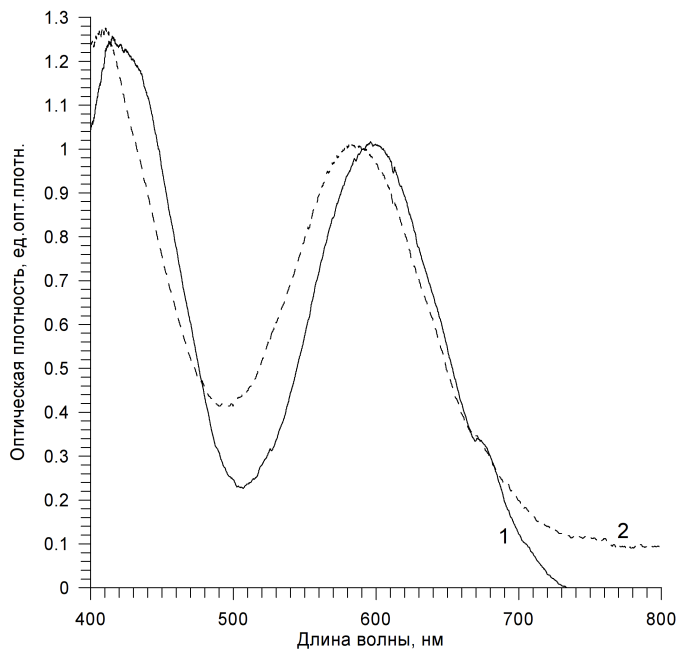


Рис. 1. Спектр хромовой смеси при мокром сжигании биомассы ФМ. 1 — Мокрое сжигание биомассы при температуре ниже 150 °С. 2 — Мокрое сжигание биомассы при температуре выше 150 °С, когда бихромат калия разлагается.

вещества достичь не удаётся. Ранее это обстоятельство было упущено из виду, поэтому в качестве окислителя при мокром сжигании предпочтительно использовался бихромат калия при температуре, не превышающей 150 °С. Не стали исключением и методики мокрого сжигания для оценки плотности культур ФМ [1, 16]. Однако неполное сжигание биомассы не позволяет использовать бихроматное окисление для некоторых представителей ФМ. Например, по нашим данным, биомасса морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin, характеризующаяся высоким содержанием соединений кремния [19], в хромовой смеси рас-

творяется не полностью, что приводит к трудностям использования метода мокрого сжигания из-за значительных ошибок измерений.

На практике при исследовании плотных культур из-за их физических и биологических особенностей мокрое сжигание часто является практически единственным методом, позволяющим оценить плотность культуры ФМ. К примеру, для интенсивного культивирования диатомей необходимо использовать соли кремниевой кислоты, при растворении которых в присутствии фосфатов, солей кальция и магния образуется оптически активный коллоидный раствор гидрозоля, что делает практически невозможным использование оптических методов для оценки плотности культуры; невозможность использования гравиметрических методов связана с тем, что образуемый гидрозоль тяжелее воды; концентрированные питательные среды вызывают агглютинацию клеток, что не позволяет вести их подсчёт и т. д. (см. рисунок 2).

Цель данной работы — разработать методику оценки плотности культур ФМ различных систематических групп на основе йодатной окисляемости.

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В работе использовали альгологически чистые культуры ФМ: *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl., *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross из коллекции культур микроводорослей ИМБИ (г. Севастополь).

Условия культивирования. Культуры ФМ, полученные из музея, к условиям интенсивного культивирования адаптировали на люминистате, используя стандартные минеральные питательные среды (см. таблицу 1). ФМ выращивали в режиме накопительного культивирования при оптимальных температурах, в культиваторах плоскопараллельного типа, с рабочим объёмом культуры 2 л, рабочим



Рис. 2. Культура бентосной диатомеи *Cylindrotheca closterium* в минеральной питательной среде, в состав которой входят соли кремневой кислоты. Образующий оптически активный гидрозоль тяжелее воды, поэтому клетки с гидрозолью оседают на дно, при этом плотность культуры определить ни оптическими, ни гравиметрическими методами невозможно.

слоем 5 см и освещаемой поверхностью $0,0425 \text{ м}^2$. В качестве источника освещения использовали люминесцентные лампы ЛБ-40, которые давали среднюю освещённость на поверхности культиватора $13,25 \text{ клк}$ (37 Вт/м^2). Культуры перемешивали посредством барботаж воздуха ($0,5 \text{ л}$ воздуха на 1 л культуры в минуту). Плотность культуры определяли в начале стационарной фазы роста параллельно двумя методами: методом йодатной окисляемости и прямого взвешивания сырой массы. Результаты измерений различными методами обрабатывали статистически для $p = 0,95$ и $n \geq 5$. Для расчёта коэффициента линейной регрессии использовали метод наименьших квадратов без учета его несимметричности.

Таблица 1. Перечень стандартных питательных сред и оптимальных температур для исследуемых фототрофных микроорганизмов.

Вид ФМ	Питательная среда	Температура, t °C	Литература
<i>A. platensis</i>	Заррук	34±1	[20]
<i>Ph. tricornutum</i>	Тренкеншу	19±1	[21]
<i>C. closterium</i>	RS	16±1	[19]
<i>P. cruentum</i>	Тренкеншу	26±1	[21]
<i>Ch. vulgaris</i>	Тамия	30±1	[1]

Массовую долю золы ФМ для каждой стадии накопительного роста определяли посредством озоления навесок при температуре 550 °C. При озолении в качестве дополнительного окислителя использовали 10% спиртовой раствор нитрата магния.

Гравиметрический метод. Фиксированный объём суспензии (5 мл) клеток центрифугировали при 1600 g в течение 15 минут. После осаждения сырую массу высушивали до постоянного веса в течение 24 ч при 105 °C [1]. Полученную таким образом сухую массу взвешивали с погрешностью 0,0001 г и рассчитывали плотность ФМ в 1 л суспензии.

Методика йодаиной окисляемости. Для мокрого сжигания использовали модификацию методики окисляемости органических веществ, содержащихся в воздухе [17]. К навеске 5–30 мг сырой массы (что соответствует 0,5–3 мг сухой массы) ФМ¹ добавляли 0,05 г йодата калия и 1 мл концентрированной серной кислоты². После перемешивания смесь выдерживали при температуре 195±2 °C в

¹Поскольку для культивирования водорослей использовали минеральные питательные среды (см. таблицу 1), сырую массу водорослей водой не промывали.

²В работе [17] для окисления органических веществ использовали предварительно приготовленный реактив. Для этого к 0,25–0,30 г измельчённого в тонкий порошок КЮ₃ приливали 0,5 мл Н₂SO₄ и удерживали смесь при 195 °C до полного растворения КЮ₃. Однако использование такого реактива в нашем случае

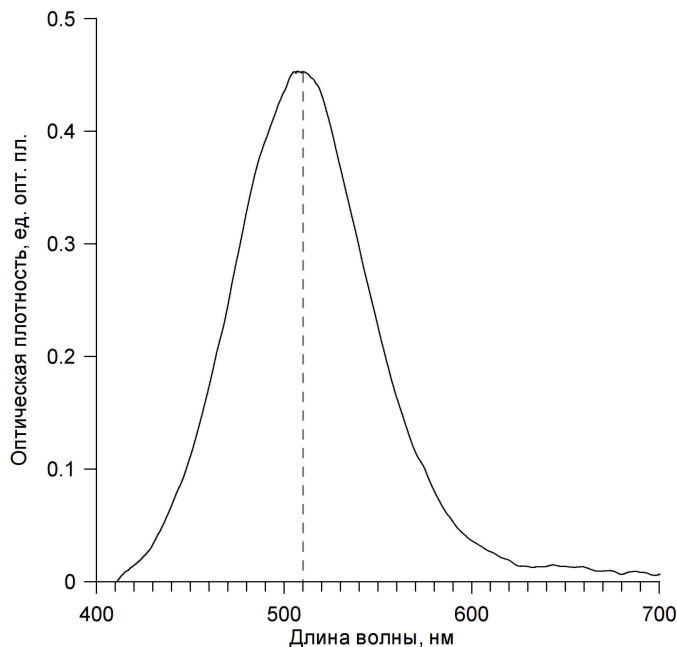


Рис. 3. Спектр поглощения раствора йода в хлороформе.

течение 25–30 минут до полного растворения биомассы и йодата калия. Смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 10 мл дистиллированной воды. Из полученной смеси йод экстрагировали 5 мл хлороформа. Концентрацию йода в хлороформе определяли спектрофотометрически на длине волны 510 нм (см. рисунок 3). Если оптическая плотность превышала 0,8 ед.опт.плт. (кювета 1 см), то разбавляли раствор йода хлороформом либо разбавляли морской водой культуру, отобранную из фотобиореактора, с последующим учётом коэффициента разбавления.

неприемлемо, поскольку чувствительность метода повышается на порядок, что требует использование малых (>0,1 мг) навесок биомассы.

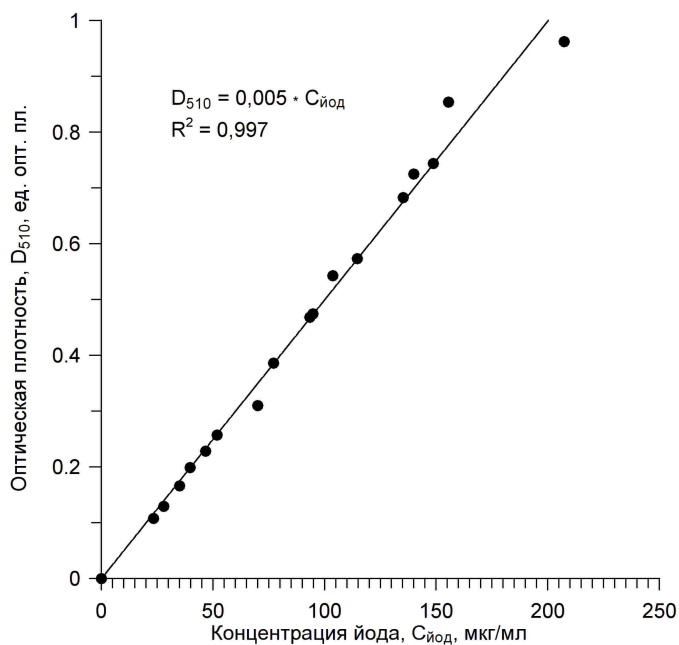


Рис. 4. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности на длине волны 510 нм (кювета 1 см) от концентрации йода в хлороформе.

Для построения калибровочной кривой зависимости оптической плотности от концентрации йода в хлороформе использовали кристаллы йода, полученные возгонкой (см. рисунок 4). По массе выделявшегося йода определяли массу ФМ (см. рисунок 5).

Результаты

После мокрого сжигания биомасса полностью растворялась. Раствор серной кислоты становился абсолютно прозрачным со светло-жёлтым оттенком (см. рисунок 6). При последующем добавлении воды для полной экстракции йода достаточно было 5 мл хлорофор-

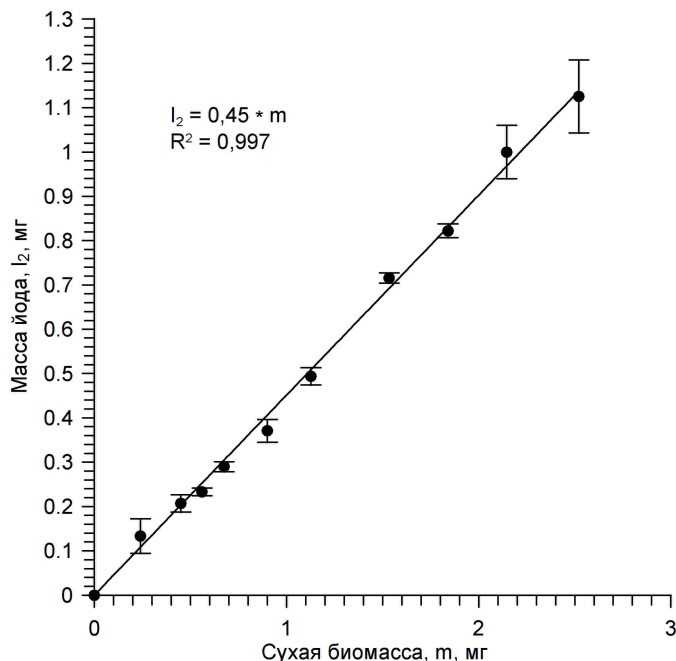


Рис. 5. Зависимость количества выделившегося йода при мокром сжигании от массы навески морской диатомеи *C. closterium*.

ма. При повторной экстракции хлороформ практически не окрашивался. Экспериментально установлены границы рабочего диапазона для сжигания сырой массы ФМ: от 5 до 30 мг (что соответствует 0,5–3 мг сухой массы). При сжигании навесок менее 5 мг оптическая плотность для кюветы в 1 см составляла 0,07 единиц или меньше, а при сжигании навески более 30 мг наблюдалось выделение йода в виде паров. Время полного окисления навески без потерь йода не превышало 25–30 минут. То, что по истечении 25 минут проба оставалась интенсивно окрашенной (приобретала жёлто-оранжевую окраску), или оптическая плотность раствора йода в хлороформе, с учётом коэффициента разбавления, превышала 1,2



Рис. 6. Раствор йодата калия в серной кислоте после мокрого сжигания биомассы ФМ.

единиц свидетельствовало о потерях йода во время сжигания пробы при температуре 195 °С. В таком случае необходимо было уменьшение навески ФМ либо увеличение объёма серной кислоты до 2 мл и массы йодноватокислого калия — до 0,1 г.

При мокром сжигании наблюдалась прямая пропорциональная зависимость между массой выделяющегося йода и массой водорослей (см. рисунок 5). Для оценки плотности культуры в фотобиореакторе методом йодатного окисления экспериментально была установлена линейная зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе после мокрого сжигания биомассы ФМ различных систематических групп от плотности культуры в фотобиореакторе (см. рисунок 7, 8).

Зольный остаток во всех стадиях накопительного роста культур ФМ оставался практически неизменным и составлял $32,5 \pm 0,5\%$ сухой массы *C. closterium*, $8,1 \pm 0,5\%$ — для *A. platensis*, $12,0$

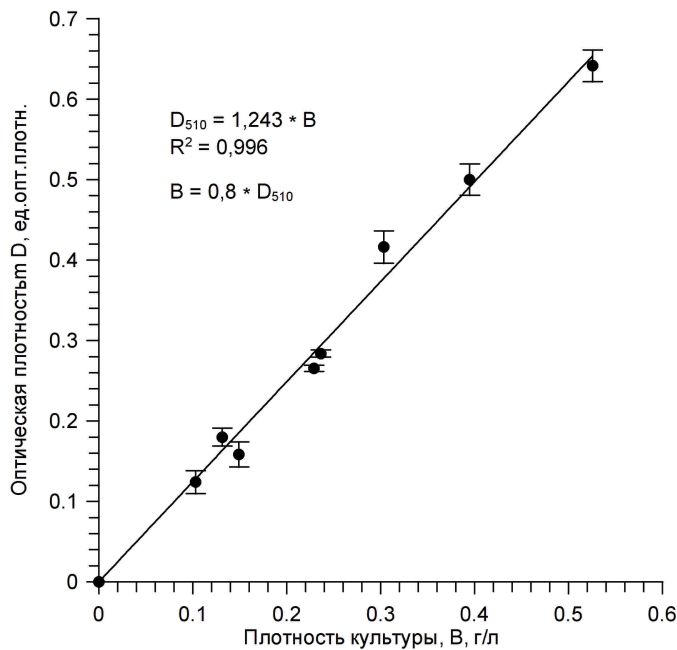


Рис. 7. Зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе на длине волны 510 нм (кювета 1 см) от плотности культуры *C. closterium* в фотобиореакторе при мокром сжигании биомассы.

$\pm 0,5\%$ — для *Ph. tricornutum*, $10,0 \pm 0,5\%$ — для *P. cruentum* и $9,0 \pm 0,5\%$ — для *Ch. vulgaris*.

Для нахождения связи оптической плотности и плотности культуры использовали условные средние измерений, поскольку среднее значение характеризуется меньшей дисперсией [22]. Стандартное отклонение измерений не зависело от среднего значения (см. рисунок 9), поэтому ошибки измерений считали нормальными и независимыми. Близость коэффициента корреляции к единице ($r > 0,98$) позволила использовать метод наименьших квадратов без учета его несимметричности [23].

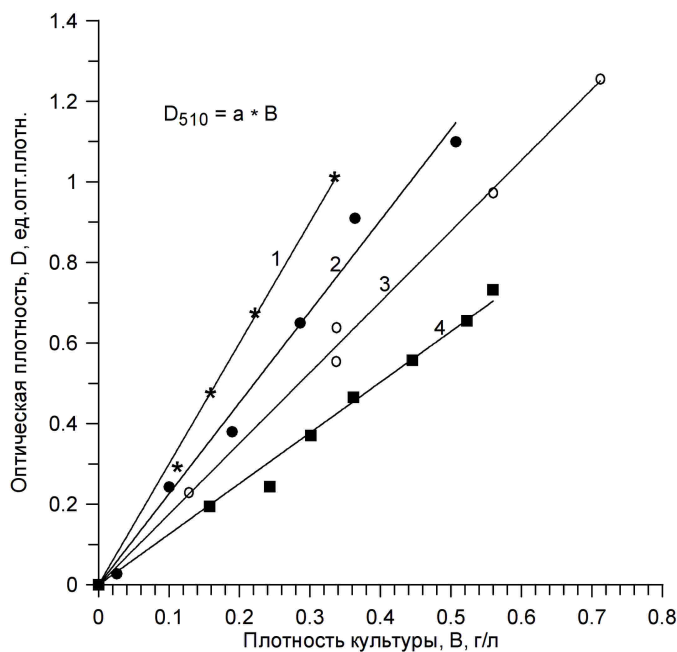


Рис. 8. Зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе от плотности культур различных систематических групп при мокром сжигании: 1 — *Chlorella vulgaris* ($a = 3$, $R^2 = 0,99$); 2 — *Phaeodactylum tricornutum* ($a = 2,26$, $R^2 = 0,988$); 3 — *Spirulina (Arthrospira) platensis* ($a = 1,76$, $R^2 = 0,99$); 4 — *Porphyridium cruentum* ($a = 1,26$, $R^2 = 0,99$).

В качестве тестовой выборки использовали 36 параллельных измерений плотности культуры в фотобиореакторе прямым методом взвешивания биомассы и методом йодатной окисляемости (см. рисунок 10).

Обсуждение

Несмотря на то, что история применения йодата в концентрированной серной кислоте в качестве окислителя насчитывает более

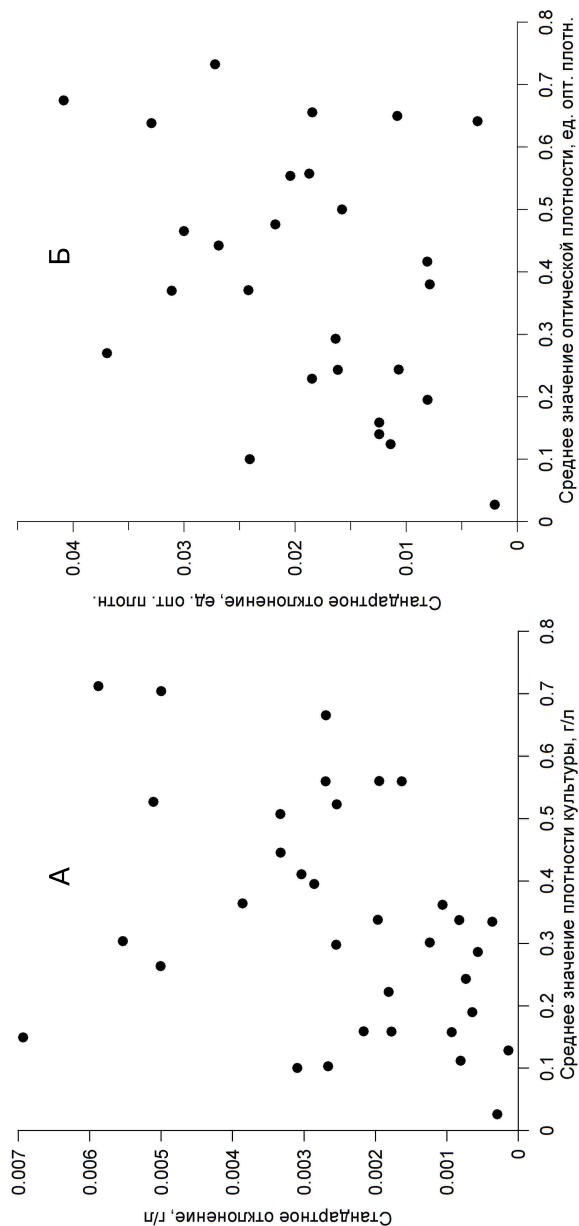


Рис. 9. Зависимость стандартного отклонения от средних значений плотности культуры (А) и оптической плотности раствора йода в хлороформе (Б).

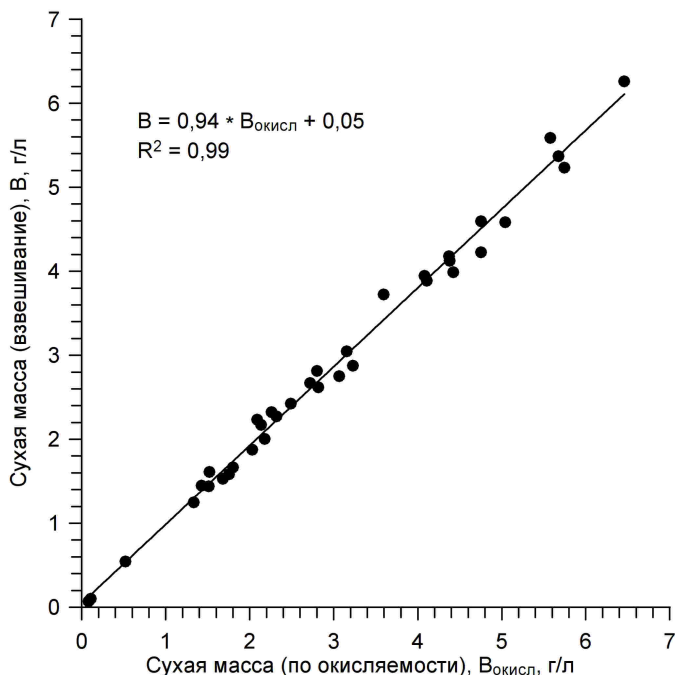


Рис. 10. Тестовая выборка из 36 параллельных измерений плотности культуры в фотобиореакторе прямым методом взвешивания биомассы и методом йодатной окисляемости органического вещества.

100 лет имеющаяся литература по этому вопросу крайне немногочисленна. До сих пор не ясны механизм и этапы окислительного процесса, а также отсутствует исчерпывающее описание свойств раствора йодата в концентрированной серной кислоте, поэтому для описании схемы процесса окисления учитывают формально только конечные продукты реакции [14]. В отличие от водных растворов йодат в концентрированной серной кислоте обладает уникальной особенностью: и при низких, и при высоких температурах (200–220 °С) в присутствии восстановителя выделение паров йода не происходит. Этот экспериментально установленный факт даёт ос-

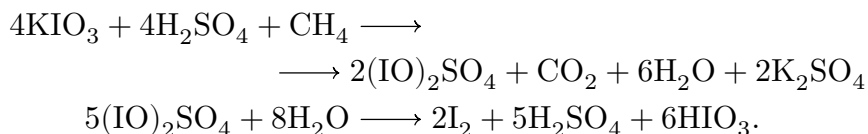
нование считать, что при мокром сжигании процесс окисления идет в два этапа:

1. В концентрированной серной кислоте в присутствии восстановителя йодат образует устойчивое соединение дийодозил-сульфат $(\text{IO})_2\text{SO}_4$ (соединение типа $[\text{I}_2\text{O}_3 \cdot \text{SO}_3]$) [24–26].
2. При разбавлении смеси водой данное соединение быстро разлагается с выделением свободного йода [17].

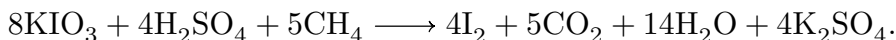
Двухстадийность процесса йодатного окисления покажем на примере некоторых предельных углеводов.

Окисление метана

Окисляемость метана³ раствором йодата калия в серной кислоте:

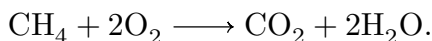


Объединяя две стадии, запишем общее уравнение процесса окисления:



Далее, учитывая молярные массы, легко заметить, что при окислении $5 \cdot 16,04 = 80,2$ г метана выделяется $4 \cdot 2 \cdot 126,9 = 1015,2$ г йода. Следовательно, при окислении 1 г метана выделяется $1015,2/80,2 = 12,658$ г йода.

При окислении метана молекулярным кислородом уравнение реакции имеет вид:



³В работе [17] отмечено, что метан йодатом калия не окисляется. Однако по нашим данным с теоретической точки зрения окисление всё же возможно.

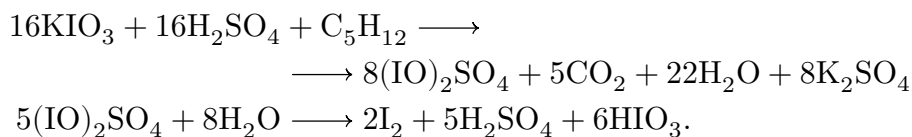
Откуда видно, что при окислении 16,04 г метана расходуется $2 \cdot 32 = 64$ г кислорода. Т. е. на окисление 1 г метана расходуется $64/16,04 = 3,989$ г кислорода.

Разделив массу выделившегося йода на массу потреблённого для окисления кислорода, имеем:

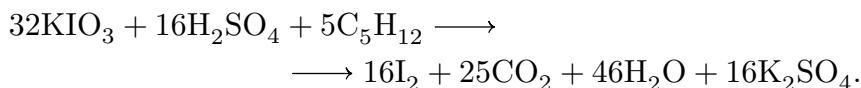
$$\frac{\text{масса йода}}{\text{масса кислорода}} = \frac{12,658}{3,989} = 3,17.$$

Окисление пентана

Уравнение йодатной окисляемости пентана аналогично уравнению окисляемости метана:

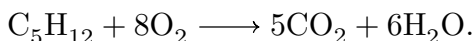


Общее уравнение процесса йодатного окисления:



Из уравнения ясно, что при окислении $5 \cdot 72,15 = 360,75$ г пентана выделяется $16 \cdot 2 \cdot 126,9 = 4060,8$ г йода. Следовательно, при окислении 1 г пентана выделяется $4060,8/360,75 = 11,26$ г йода.

Окисление пентана молекулярным кислородом:



Т. е. для окисления 72,15 г пентана необходимо $8 \cdot 32 = 256$ г кислорода. Или на окисление 1 г пентана расходуется $256/72,15 = 3,55$ г кислорода.

Отношение масс йода и кислорода равно:

$$\frac{\text{масса йода}}{\text{масса кислорода}} = \frac{11,26}{3,55} = 3,17.$$

Вышеприведённые примеры демонстрируют двустадийность полного окисления предельных углеводов. Подобные уравнения реакций можно составить для любых классов органических соединений. Однако для более сложных соединений уравнения являются достаточно громоздкими, поэтому в дальнейшем для краткости изложения ограничимся лишь общими уравнениями реакций окисляемости веществ.

Обратим внимание на то, что значения соотношений масс выделяющегося йода и потребляемого кислорода при окислении метана и пентана удивительным образом совпадают и равны 3,17. В работе [18] этот факт объясняется тем, что йодат калия в серной кислоте выступает в роли источника кислорода при окислении органического вещества. Т. е. при окислении существует строгая закономерность между массой выделяющегося йода и массой потреблённого кислорода:

$$\frac{6 M(I)}{15 M(O)} = 3,1726.$$

Таблица 2. Йодатная окисляемость некоторых трудно окисляемых органических соединений.

Масса выделяющегося йода (I_2) при окислении 1 г вещества	Масса кислорода (O_2), затраченного на окисление 1 г вещества	Соотношение $k = \frac{I_2}{O_2}$
Хлороформ		
Общее уравнение йодатной окисляемости хлороформа: $2KIO_3 + H_2SO_4 + 5CHCl_3 + 4H_2O \longrightarrow I_2 + 5CO_2 + 15HCl + K_2SO_4$ Окисляемость хлороформа молекулярным кислородом: $2 CHCl_3 + O_2 + 2 H_2O \longrightarrow 2 CO_2 + 6 HCl$		
0,425	0,134	3,17

Трихлоруксусная кислота (ТХУ)		
Общее уравнение йодатной окисляемости ТХУ: $5\text{CCl}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{SO}_4 + 2\text{KIO}_3 + 4\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{I}_2 + 10\text{CO}_2 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 15\text{HCl}$ Окисляемость ТХУ молекулярным кислородом: $2\text{CCl}_3\text{COOH} + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 4\text{CO}_2 + 6\text{HCl}$		
0,31	0,098	3,16
Бензол		
Общее уравнение йодатной окисляемости бензола: $6\text{KIO}_3 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{C}_6\text{H}_6 \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 3\text{I}_2 + 3\text{K}_2\text{SO}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$ Окисляемость бензола молекулярным кислородом: $2\text{C}_6\text{H}_6 + 15\text{O}_2 \longrightarrow 12\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$		
9,76	3,08	3,17
Фталевая кислота		
Общее уравнение йодатной окисляемости фталевой кислоты: $6\text{KIO}_3 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4 \longrightarrow 8\text{CO}_2 + 3\text{I}_2 + 3\text{K}_2\text{SO}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$ Окисляемость фталевой кислоты молекулярным кислородом: $2\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4 + 15\text{O}_2 \longrightarrow 16\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$		
4,58	1,444	3,17

Действительно, эту закономерность можно наблюдать практически для любых органических соединений. Исключение составляют: мочеви́на, фосген, четырёххлористый углерод и некоторые гетероциклические соединения азота, — органические вещества, которые не подвержены йодатному окислению. В качестве примера рассмотрим окисляемость некоторых трудно окисляемых органических веществ (см. таблицу 2), в том числе экспериментально апробированных в работах [11, 17].

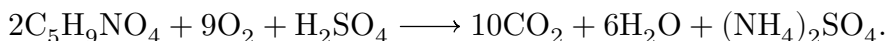
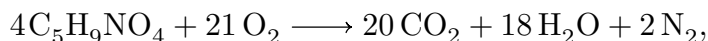
Распространяя логику рассуждений таблицы 2 на органические молекулы природного происхождения, легко показать, что при окислении основных классов органических соединений отношение массы выделяющегося йода к массе затраченного кислорода также равно $k=3,17$. В таблицах 3, 4 представлены уравнения реакций окисляемости органических веществ, которые в наибольшем количестве присутствуют в биомассе ФМ [27–30].

Таблица 3. Йодатная окисляемость органических соединений природного происхождения. Углеводы, липиды.

УГЛЕВОДЫ		
Масса выделяющегося йода (I_2) при окислении 1 г вещества	Масса кислорода (O_2), затраченного на окисление 1 г вещества	Соотношение $k = \frac{I_2}{O_2}$
Глюкоза		
Общее уравнение йодатной окисляемости глюкозы: $5 C_6(H_2O)_6 + 24 KIO_3 + 12 H_2SO_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 12 I_2 + 12 K_2SO_4 + 42 H_2O + 30 CO_2$ Окисляемость глюкозы молекулярным кислородом: $C_6(H_2O)_6 + 6 O_2 \longrightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$		
3,39	1,07	3,17
Крахмал, целлюлоза		
Общее уравнение йодатной окисляемости крахмала и целлюлозы: $5(C_6H_{10}O_5)_n + 24 nKIO_3 + 12 nH_2SO_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 12 nI_2 + 12 nK_2SO_4 + 37 nH_2O + 30 nCO_2$ Окисляемость крахмала и целлюлозы молекулярным кислородом: $(C_6H_{10}O_5)_n + 6 nO_2 \longrightarrow 6 nCO_2 + 5 nH_2O$		
3,757	1,184	3,17

ЛИПИДЫ		
Пальмитиновая кислота		
Общее уравнение йодатной окисляемости пальмитиновой кислоты: $5 \text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2 + 92 \text{KIO}_3 + 46 \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 46 \text{I}_2 + 46 \text{K}_2\text{SO}_4 + 126 \text{H}_2\text{O} + 80 \text{CO}_2$		
Окисляемость пальмитиновой кислоты молекулярным кислородом: $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2 + 23 \text{O}_2 \longrightarrow 16 \text{CO}_2 + 16 \text{H}_2\text{O}$		
9,13	2,88	3,17
Трипальмитин		
Общее уравнение йодатной окисляемости трипальмитина: $\text{C}_{51}\text{H}_{98}\text{O}_6 + 58 \text{KIO}_3 + 29 \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 29 \text{I}_2 + 29 \text{K}_2\text{SO}_4 + 78 \text{H}_2\text{O} + 51 \text{CO}_2$		
Окисляемость трипальмитина молекулярным кислородом: $2 \text{C}_{51}\text{H}_{98}\text{O}_6 + 145 \text{O}_2 \longrightarrow 102 \text{CO}_2 + 98 \text{H}_2\text{O}$		
9,12	2,87	3,177

Прежде чем представить теоретический анализ окисляемости азотсодержащих органических соединений, обратим внимание на азотсодержащие продукты реакции окисления: при йодатном окислении аминокислот и белков в серной кислоте образуется $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а при окислении молекулярным кислородом — N_2 . В результате подсчёта коэффициент k получается несколько заниженным $k=2,7$. Однако при окислении азотсодержащих веществ молекулярным кислородом в серной кислоте, также как и при окислении йодатном, в продуктах реакции образуется сульфат аммония, при этом коэффициент $k=3,17$. Продемонстрируем сказанное на примере окисляемости глутаминовой кислоты:



В первом случае на окисление 1 г глутаминовой кислоты расходуется 1,14 г кислорода, во втором — 0,98 г. Поэтому для первого уравнения $k=2,7$, в то время как для второго — $k=3,17$.

Таблица 4. Йодатная окисляемость органических соединений природного происхождения. Аминокислоты и белки.

Масса выделяющегося йода (I_2) при окислении 1 г вещества	Масса кислорода (O_2), затраченного на окисление 1 г вещества	Соотношение $k = \frac{I_2}{O_2}$
Глутаминовая кислота		
Общее уравнение йодатной окисляемости глутаминовой кислоты: $10 C_5H_9NO_4 + 36 KIO_3 + 23 H_2SO_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 18 I_2 + 18 K_2SO_4 + 48 H_2O + 5 (NH_4)_2SO_4 + 50 CO_2$		
Окисляемость молекулярным кислородом в серной кислоте: $2 C_5H_9NO_4 + 9 O_2 + H_2SO_4 \longrightarrow 6 H_2O + (NH_4)_2SO_4 + 10 CO_2$		
3,105	0,98	3,17
Белок (усреднённая формула)		
Общее уравнение йодатной окисляемости белка: $10 C_{99}H_{157}O_{32}N_{26}S + 834 KIO_3 + 537 H_2SO_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 417 I_2 + 417 K_2SO_4 + 802 H_2O + 130 (NH_4)_2SO_4 + 990 CO_2$		
Окисляемость молекулярным кислородом в серной кислоте: $4 C_{99}H_{157}O_{32}N_{26}S + 417 O_2 + 48 H_2SO_4 \longrightarrow$ $\longrightarrow 154 H_2O + 52 (NH_4)_2SO_4 + 396 CO_2$		
4,69	1,48	3,17

С учётом вышесказанного в таблице 4 представлено уравнение для окисляемости аминокислот на примере глутаминовой кислоты и окисляемости белков с использованием усреднённой формулы $C_{99}H_{157}O_{32}N_{26}S$. Усреднённая формула белка получена на основе информации об элементарном составе белка (см. таблицу 5) и

отношении долей элементов:

$$C : H : O : N : S.$$

$$\frac{52,5}{M(C)} : \frac{6,9}{M(H)} : \frac{22,5}{M(O)} : \frac{16,3}{M(N)} : \frac{1,4}{M(S)}$$

Откуда

$$99,43 : 156,82 : 32 : 26,45 : 1 \quad \text{т. е.} \quad C_{99}H_{157}O_{32}N_{26}S.$$

Таблица 5. Элементарный анализ различных белков (в % на сухой вес) [31].

Элемент	% в белке	Среднее, %
C	50 – 55	52,5%
H	6,5 – 7,3	6,9%
O	21,5 – 23,5	22,5%
N	15,0 – 17,6	16,3%
S	0,3 – 2,5	1,4%

Из таблиц 2, 3, 4 видно, что при окислении практически всех органических соединений отношение массы выделяющегося йода к массе затраченного кислорода равно $k=3,17$. Следовательно, при окислении биомассы ФМ в целом данное отношение будет близко к 3,17. Действительно, учитывая массовую долю белка, липидов и углеводов, при окислении биомассы 25 видов диатомей разного биохимического состава [32] коэффициент k находится в пределах от 3,174 до 3,175. Аналогично: для 6 видов цианобактерий k находится в пределах от 3,170 до 3,172 и для 6 видов зелёных микроводорослей — в пределах от 3,170 до 3,174 [29, 33].

Таким образом, масса выделяющегося йода линейно связана с массой затраченного кислорода при окислении органического

вещества. Следовательно, при малых изменениях доли зольного остатка клеток масса выделившегося йода будет линейно связана с массой водорослей. Действительно, обратившись к рисунку 5, на котором представлены экспериментальные данные для морской диатомеи, можно убедиться, что линейная связь очевидна ($R^2=0,997$).

Если масса выделяющегося йода и масса водорослей связаны линейно, то линейной будет связь между оптической плотностью раствора йода в хлороформе (см. рисунок 3) и плотностью культуры в фотобиореакторе. Доказательством этому утверждению могут служить экспериментальные данные, представленные на рисунке 7, где плотность культуры морской диатомеи в фотобиореакторе с высокой сходимостью результатов (см. таблицу 6) линейно связана с оптической плотностью йода в хлороформе после мокрого сжигания.

Таблица 6. Метрологические характеристики оценки плотности культуры *C. closterium* методом йодатной окисляемости. Обозначения: B — плотность культуры в фотобиореакторе, г/л; m — среднее значение из 5 измерений плотности культуры методом йодатной окисляемости, г/л; S — среднеквадратическое отклонение, г/л; V — коэффициент вариации, %; P — доверительный интервал для $p=0,95$.

№	B , г/л	m , г/л	S , г/л	V , %	P
1	0,228	0,227	0,003	1,26	0,0035
2	0,223				
3	0,224				
4	0,227				
5	0,231				

Аналогичные зависимости получены для всех исследуемых культур ФМ (см. рисунок 8): *Ph. tricornutum*, (диатомовые) *A. platensis* (цианобактерии), *P. cruentum*, (красные микроводоросли) *Ch. vulgaris* (зелёные микроводоросли). По нашим данным, зольный остаток во всех экспериментах оставался практически

неизменным для всех исследуемых видов ФМ, поэтому линейные зависимости наблюдались как для цианобактерий, так и для красных, зелёных и диатомовых микроводорослей.

В заключение представим тестовую выборку из 36 параллельных измерений плотности культуры морской диатомеи *C. closterium* в различных стадиях роста двумя методами (см. рисунок 10). Линейная связь во всём диапазоне с углом наклона, близким к единице, а также со свободным членом, близким к нулю, даёт основание считать, что разработанный нами метод йодатной окисляемости вполне применим для оценки плотности культуры ФМ в фотобиореакторе.

Отметим также то, что в сравнении с опубликованными ранее методиками йодатной окисляемости [11, 14] разработанный нами метод более простой, малозатратный по времени и расходу реактивов. Кроме того, предложенный метод удобен при работе с большими сериями проб и может служить альтернативой стандартному методу бихроматной окисляемости в гидробиологической практике.

Список литературы

1. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
2. Воронова О. К. Методика определения сухой биомассы микроводорослей в условиях интенсивного культивирования // Альгология. — 1984. — Т. 4, № 4. — С. 59–62.
3. Геворгиз Р. Г., Алисиевич А. В., Шматок М. Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры // Экология моря. — 2005. — Вып. 70. — С. 96–106.

4. Чеканов К. А., Соловченко А. Е. Возможности и ограничения неdestructивного оптического мониторинга культур одноклеточных зеленых водорослей при сбалансированном росте // Физиология растений. — 2015. Т. 62, № 2. — С. 291–300.
5. Количественный химический анализ вод : методика измерений обилия и индикации изменений состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом : ПНД Ф 14.2.268-2012 / [разработчики: Д. Н. Маторин, В. А. Осипов, Е. Н. Воронова и др.]. — Москва. — 2012. — 35 с.
6. Филипповский Ю. Н., Бородин М. Д., Анисимов О. Л., Попова Е. С., Козорезов А. В. Способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов. А. с. СССР № 882486 // Б. И. — 1981. — № 43. — С. 3.
7. Терсков И. А., Гительзон И. И., Сидько Ф. Я. Интенсивное непрерывное культивирование хлореллы в плотностном режиме при различной освещенности // Управляемое культивирование микроводорослей. — 1964. — М. : Наука. — С. 55–84.
8. Винберг Г. Г. Методы определения продукции водных животных. Методическое руководство и материалы. — Минск, 1968. — 246 с.
9. Strickland J. D. H., Parsons T. R. A practical handbook of seawater analysis. — Canada : Bull. Fish. Res. Bd., — 1968. — V. 167. — 311 p.
10. Довнар В. С. Методика определения теплоты сгорания сухого вещества растений и аминокислот // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя аграрных навук. — 2006. — № 3. — С. 71–76.

11. Williams R. J., Rohrman E., Christense B. E. Organic Oxidation Equivalent Analysis. II. By the Use of Iodate. (Micro and "Sub-micro" Methods) // J. Am. Chem. Soc. — 1937. — V. 59. — P. 291–293.
12. Ларионов Ю. В., Скопинцев Б. А. Перманганатная и бихроматная окисляемость органического вещества взвесей водоемов разной степени трофности // Биол. внутр. вод. Информ. Бюлл. — 1980. — № 46. — С. 49–53.
13. Лурье Ю. Ю. Унифицированные методы анализа вод. — М. : Химия, 1973. — 376 с.
14. Карзинкин Г. С., Тарковская О. И. Определение калорийности в малых навесках // Тр. Томск. Ун-та. — 1960. — Т. 148. — С. 103–108.
15. Копытов Ю. П., Лелеков А. С., Геворгиз Р. Г., Нехорошев М. В., Новикова Т. М. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей // Альгология. — 2015. — Т. 25, № 2. — С. 35–40.
16. Копытов Ю. П., Дивавин И. А., Цымбал И. М. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов // Рациональное использование ресурсов моря — важный вклад в реализацию продовольственной программы: Материалы конференции (Севастополь, 10–11 декабря. 1984 г.). — Севастополь, 1984. — Ч. 2. — С. 227–231.
17. Гуревич В. Г., Рудинская Е. М., Протопопова В. П. Колориметрический метод определения общего органического углерода // Заводская лаборатория. — 1946. — № 4–5. — С. 422–425.

18. Strebinger R. Bestimmung des Sauerstoffgehaltes organischer Substanzen // Zeitsch. f. annal. Chemie. — 1919. — V. 58. — P. 97–114.
19. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г., Бобко Н. И., Лелеков А. С. Питательная среда для интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin — перспективного объекта биотехнологий // Актуальная биотехнология. — 2015. — Т. 14, №. 3. — С. 46–48.
20. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D thèse. — Paris, 1966. — 114 p. — (A la faculté des sciences de l'université de Paris)
21. Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов микроэлементного питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch // Биология моря. — 1979. — № 51. — С. 41–46.
22. Митропольский А. К. Техника статистических вычислений. — М. : Наука, 1971. — 576 с.
23. Новицкий П. В., Зограф И. В. Оценка погрешностей измерений. — 2-е изд., перераб. и доп. — Л. : Энергоатомиздат. Ленингр. отд-ние, 1991. — 304 с.
24. Некрасов Б. В. Основы общей химии. — М. : Химия, 1973. — Т. 1. — 656 с.
25. Furuseth S., Selte K., Hope H., Kjekshus A., Klewe B. Iodine Oxides. Part V. The Crystal Structure of $(\text{IO})_2\text{SO}_4$ // Acta Chemica Scandinavica. — 1974. — V. 28A. — P. 71–76, doi: 10.3891/acta.chem.scand.28a-0071.

26. Ahmed M. A. K., Fjellvåg H., Kjekshus A. Different Routes in the Synthesis of $(\text{IO})_2(\text{SO}_4)_{1-x}(\text{SeO}_4)_x$ // *Acta Chemica Scandinavica*. — 1994. — V. 48A. — P. 537–541, doi: 10.3891/acta.chem.scand.48-0537.
27. Brown M. R., Jeffrey S. W. The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture // *Journal of Applied Phycology*. — 1995. — V. 7. — P. 521–527.
28. Serrazanetti G. P., Folicaldi A., Guerrini F., Monti G., Pistocchi R., Boni L. Microalgal lipid markers for paleoclimatic research // *Clim. Res.* — 2006. — V. 31. — P. 145–150.
29. Canizares-Villanueva R. O., Dominguez A. R., Cruz M. S., Rios-Leal E. Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater // *Bioresource technology*. — 1995. — V. 51. — P. 111–116.
30. Барашков Г. К. Сравнительная биохимия водорослей. — М., 1972. — 136 с.
31. Краткая химическая энциклопедия / Ред. И. Л. Кнунянц. — М., 1961. — Т. 1. — 931 с.
32. Scholz B., Liebezeit G. Biochemical characterisation and fatty acid profiles of 25 benthic marine diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea) // *J. Appl. Phycol.* — 2012. — V. 25, iss. 2. — P. 453–465, doi: 10.1007/s10811-012-9879-0.
33. Becker E. W. Micro-algae as a source of protein // *Biotechnology Advances*. — 2007. — V. 25. — P. 207–210.

Геворгиз Руслан Георгиевич
e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Железнова Светлана Николаевна
e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru

Никонова Лариса Леонидовна
e-mail: lar_sa1980@mail.ru

Бобко Николай Иванович
e-mail: n.bobko@yandex.ru

Нехорошев Михаил Валентинович
e-mail: mnekhoroshev@gmail.com

R. G. Gevorgiz, S. N. Zheleznova, L. L. Nikonova, N. I. Bobko, M. V. Nekhoroshev. Estimation of microalgae culture density by iodate oxidation method. — Sevastopol, 2015. — 31 p.

A simple method for assessment of the microorganisms culture density, based on biomass oxidation by potassium iodate in sulfuric acid, has been developed. This method allows to achieve substantially complete oxidation to carbon dioxide of all organic substances, including saturated hydrocarbons and organic acids. The suggested method is based on two processes: 1) biomass oxidation with formation of $(\text{IO})_2\text{SO}_4$ (diiodosyl sulfate); 2) decomposition of $(\text{IO})_2\text{SO}_4$ with formation of iodine. It was found out that the relation of emitted iodine mass to the spent oxygen mass comes nearer to three. The linear dependence of optical density of chloroform iodine solution from microorganisms (cyanobacteria, diatoms, red and green microalgae) culture density is experimentally ascertained.

Addressed to algologists, microbiologists, biotechnologists, as well as specialists of related specialties.

Keywords: cyanobacteria, microalgae, biomass, *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl., *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross.