

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

БИОКИНЕТИКА

Методические указания
по выполнению курсовой работы
для студентов направления подготовки 03.03.02 Физика
очной формы обучения

Севастополь
СевГУ
2018

УДК 577.31:001.891-057.875(075.8)
ББК 28.071я73
Б 632

Рецензент:

М.П. Евстигнеев – доктор физико-математических наук, профессор

Составители: Лелеков А.С., Воронин Д.П., Гаврилов П.Е.

Б632 Биокинетика: метод. указания по выполнению курсовой работы для студентов направления подготовки 03.03.02 Физика очной формы обучения / Сост. А.С. Лелеков, Д.П. Воронин, П.Е. Гаврилов. – Севастополь: СевГУ, 2018. – 22 с.

В пособии представлены краткие теоретические сведения, развернутый план выполнения курсовой работы по дисциплине «Биокинетика», описаны основные методики, используемые при выполнении курсовой работы.

Методические рекомендации составлены в соответствии с утвержденной рабочей программой дисциплины «Биокинетика» для направления подготовки 03.03.02 Физика, профиль «Биохимическая физика».

УДК 577.31:001.891-057.875(075.8)
ББК 28.071я73

Методические указания рассмотрены и утверждены на заседании кафедры «Физика», протокол № 7 от 27 февраля 2017 г.

Рекомендовано методической комиссией Института радиоэлектроники и информационной безопасности Севастопольского государственного университета в качестве методических указаний.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Термины и понятия	4
2. Теоретическое введение	7
2.1. Кинетические характеристики роста	8
2.2. Накопительная (периодическая) культура микроводорослей	11
3. Ход работы	13
4. Анализ и обработка результатов измерений	14
4.1. Методика определения оптической плотности на КФК-2	14
4.2. Методика измерения спектра ослабления суспензии нативной культуры микроводорослей в области ФАР	17
4.3. Методика подсчета клеток в камере Горяева	18
4.4. Методика определения оптической плотности с помощью датчика	19
4.5. Методика определения сырого (сухого) веса	20
4.6. Методика определения коэффициента поглощения световой энергии и КПД фотобиосинтеза	20
5. Вопросы для самоконтроля	22

1. ТЕРМИНЫ И ПОНЯТИЯ

Рост – это увеличение массы и объема организма за счет веществ, поступивших в процессе питания. Рост организмов отличается от роста кристаллов или иных неорганических объектов тем, что у них процессы идут внутри организма посредством построения новых клеточных и внеклеточных структур.

Размножение – это воспроизведение себе подобных организмов, что обеспечивает непрерывность и преемственность жизни в ее видовой специфичности.

Микроводоросли – одноклеточные представители царства «Растения», относящиеся к группе низших фотоавтотрофов, у которых рост происходит преимущественно за счёт процессов фотосинтеза, при этом для синтеза органических соединений используются неорганические соединения.

Фотобиосинтез – это согласованный синтез всех компонентов организма, т.е. биологический синтез живой структуры.

КПД фотобиосинтеза – отношение запасённой в биомассе энергии к поглощённой фотосинтетическими пигментами световой энергии. Величина запасённой в биомассе энергии является частью преобразованной (совершённой работы) в процессе фотобиосинтеза энергии. Другая часть преобразованной световой энергии, не запасённая в биомассе, теряется в процессах фотосинтеза (флюоресценция, диссипация и др.), расходуется на синтез экзометаболитов, структур клеток, которые теряются при делении (оболочки, жгутики) и т. д. Отношение величины преобразованной энергии к поглощённой есть максимально возможный КПД фотобиосинтеза.

Культура микроводорослей (син. монокультура, альгологически чистая культура) – популяция клеток одного вида низших фотоавтотрофов на минеральной питательной среде, у которых происходят процессы фотобиосинтеза. Обычно под термином культура низших фототрофов подразумевают некий альгобактериальный ценоз, поскольку в нестерильных условиях кроме клеток фотоавтотрофов присутствуют клетки хемогетеротрофных бактерий. Если в культуре исключена возможность развития хемогетеротрофных бактерий, то такая культура называется аксеничной.

Смешанная культура микроводорослей или цианобактерий – популяция клеток двух или более видов низших фотоавтотрофов на минеральной питательной среде, у которых происходят процессы фотобиосинтеза. Для промышленных масштабов в открытых системах культивирования, как правило, присутствуют более одного вида низших фотоавтотрофов. При этом, если преобладает один вид (95 % и более), то такую культуру можно считать альгологически чистой.

Биомасса микроводорослей или цианобактерий (от гр. *bios* - жизнь, *massa* - слиток, глыба, кусок) (син. плотность культуры) – количественная характеристика совокупности живых клеток низших фотоавтотрофов в культуре в момент наблюдения. Обычно в альгологической практике биомассу выражают в единицах массы, длины или объёма, отнесённых к объёму или к площади ос-

вещаемой поверхности. Например, грамм абсолютно сухой биомассы / на литр культуры, число клеток / на миллилитр культуры, объём сырой биомассы / на миллилитр культуры. Единицы измерения выбирают сообразно цели исследований, кроме того, на выбор единиц измерения существенное влияние оказывают используемые методы для определения биомассы. В свою очередь выбор метода для определения биомассы зависит от следующих факторов: 1) свойства биомассы, 2) свойства культуральной жидкости, 3) требуемая точность, 4) требуемая чувствительность и 5) требуемая скорость измерений. В контексте данной работы для краткости вместо термина биомасса микроводорослей или цианобактерий будет употребляться его укороченный вариант биомасса или плотность культуры.

Максимальное значение биомассы – это максимально возможная плотность накопительной культуры исследуемого вида низших фотоавтотрофов для заданных внешних условий: облучённость, начальная концентрация биогенных элементов, температура, интенсивность газообмена и т. д.

Продуктивность культуры (абсолютная наблюдаемая скорость роста) – это суммарное количество биомассы (прирост), образованной растущими и размножающимися клетками низших фотоавтотрофов в единицу времени отнесённой к единице освещаемой поверхности или единице объёма.

Максимальная продуктивность культуры – это максимальное значение абсолютной скорости роста культуры для заданных условий внешней среды (константа). Максимальная продуктивность достигается на линейном участке накопительной кривой, причём этот участок может быть достаточно мал или вырожден в точку. Следует различать понятия «линейный рост» и «линейная фаза роста». Если в первом случае речь идёт о механизме субстрат зависимых процессов в клетке, приводящих к постоянству продуктивности, тогда как во втором случае подразумевается участок накопительной кривой, границы которого обычно выбираются субъективно.

Максимальная продуктивность является кинетической характеристикой роста культуры, которая определяется величиной потока лимитирующего субстрата.

Предельная наблюдаемая продуктивность культуры – это видоспецифическая характеристика роста нелимитированной внешними условиями культуры, максимально возможное значение продуктивности (константа). Эта величина учитывает процессы потерь биомассы. Если бы отсутствовали потери биомассы, то предельная наблюдаемая продуктивность равнялась бы некоторой максимальной скорости синтеза биомассы (предельной истинной продуктивности).

Потери (уменьшение) биомассы в культуре – совокупность процессов, приводящих к уменьшению плотности культуры. В частности, потери биомассы могут происходить из-за гибели клеток, потерь клеточных структур при делении клеток, процессов темнового дыхания, выделение экзометаболитов и т.д.

Темновое дыхание культуры (син. эндогенный расход биомассы) – совокупность энергетических процессов, обеспечивающих поддержание структуры клеток (на свету и в темноте). Энергия, необходимая для поддержания структу-

ры клеток, количественно не связана с процессами роста и может быть выражена через величину потери биомассы с учётом её калорийности.

Скорость темнового дыхания культуры – это суммарное количество энергетических потерь, выраженных в уменьшении биомассы за счёт темнового дыхания, в единицу времени.

Удельная скорость темнового дыхания культуры – это кинетическая характеристика, определяющая величину скорости темнового дыхания каждой единицы биомассы.

Скорость синтеза биомассы в культуре (абсолютная истинная скорость прироста биомассы, истинная продуктивность) – сумма скоростей синтеза всех биохимических составляющих клетки для заданных внешних условий, причём, при построении единицы биомассы все скорости синтеза согласованы. Эта величина учитывает только процессы синтеза биомассы, исключая любые процессы потерь биомассы.

Удельная скорость роста культуры (син. удельная скорость размножения, темп деления клеток, удельная скорость деления, константа размножения) – это кинетическая характеристика роста культуры, определяющая величину продуктивности каждой единицы биомассы. Так как удельная скорость роста является относительной величиной, то она удобна для сравнения значения продуктивности культур различной плотности.

Максимальная удельная скорость роста культуры – это максимальное значение удельной скорости роста культуры для заданных условий внешней среды (константа). Максимальная удельная скорость роста является кинетической характеристикой роста культуры, которая определяется величиной потока световой энергии и температурой.

Удельная скорость синтеза биомассы в культуре – это кинетическая характеристика, определяющая количество синтезированной биомассы каждой единицей биомассы в единицу времени. Эта величина учитывает только процессы синтеза биомассы, исключая любые процессы потерь биомассы. В стационарном динамическом равновесии удельные скорости синтеза любой из составляющих биомассы будут одинаковыми и равны удельной скорости синтеза биомассы в целом. В нелимитированной культуре с низкой плотностью также выполняется условие равенства удельных скоростей всех биохимических составляющих для ограниченного промежутка времени в экспоненциальной фазе роста.

Абсолютное количество (концентрация) биохимического компонента биомассы – количественная характеристика биохимического компонента живых клеток низших фотоавтотрофов в культуре в момент наблюдения. Сумма всех концентраций биохимических компонентов равна абсолютному значению биомассы в момент наблюдения.

Относительная скорость синтеза биохимических составляющих биомассы – это кинетическая характеристика, определяющая количество синтезированного компонента биомассы каждой единицей биомассы в единицу времени. Сумма всех относительных скоростей синтеза равна удельной скорости синтеза биомассы. Следует различать понятия удельной и относительной ско-

рости синтеза биохимических составляющих. По определению, удельная скорость – это отношение изменения количества биохимического компонента к его текущему значению в единицу времени, в то время как относительная скорость нормирована относительно биомассы в целом.

Предельная удельная скорость роста культуры – это видоспецифическая характеристика роста нелимитированной культуры, максимально возможное значение удельной скорости роста (константа).

Истинная потребность биомассы в субстрате – количество субстрата (биогенного элемента), необходимое для биосинтеза единицы биомассы.

Экономический коэффициент прироста биомассы (син. выход биомассы) – это суммарное количество биомассы (прирост), образованной за счёт одной единицы потреблённого субстрата. Величина обратная экономическому коэффициенту называется наблюдаемая потребность. В контексте этой работы для краткости вместо термина экономический коэффициент прироста биомассы будет употребляться его укороченный вариант экономический коэффициент.

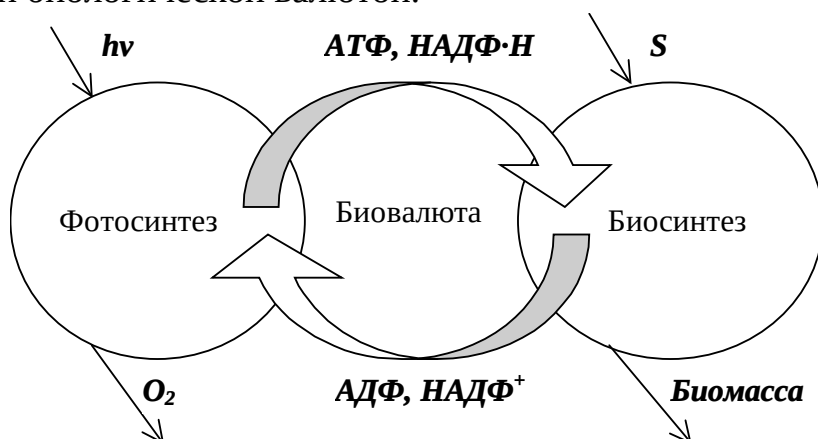
Производительность системы культивирования – суммарное количество биомассы, образованной растущими и размножающимися клетками во всем объеме системы культивирования в единицу времени.

Суспензия нативной культуры микроводорослей – это совокупность клеток микроводорослей, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой питательной (культуральной) среде.

2. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, микроводоросли, как и любые другие фотоавтотрофы, в процессе своего метаболизма синтезируют органическое вещество из неорганических веществ и двуокиси углерода. В качестве источника энергии для осуществления синтеза микроводоросли используют световую энергию. В процессе фотосинтеза энергия света трансформируется в богатые энергией соединения, которые катализируют синтез органического вещества из минеральных компонентов среды.

Общую схему процессов фотобиосинтеза микроводорослей можно представить следующим образом. Схема включает два основных процесса: фотосинтез и биосинтез. Эти процессы энергетически связаны посредством обмена универсальной биологической валютой.



Поглощение света осуществляется пигментами антенны, входящими в состав фотосинтезирующей системы. При поглощении фотона молекула пигмента переходит в возбужденное состояние и может передавать энергию другим молекулам, т.е. возбуждение может мигрировать по пигментной матрице антенны. Фотосинтезирующая система (ФС) включает также специализированные молекулы пигментов, которые за счет энергии возбуждения способны отдать электрон в дальнейшую цепь реакций фотосинтеза, называемую электрон-транспортной цепью (ЭТЦ). Пигментный комплекс, в котором происходит разделение зарядов (реакционный центр, РЦ), отдав электрон в ЭТЦ, восстанавливается либо за счет электрона от воды (при этом выделяется кислород), либо за счет возврата электрона из ЭТЦ.

Энергия фотосинтетического потока электронов, возникающего в ЭТЦ, используется в процессах фотофосфорилирования, при которых происходит образование богатых энергией соединений АТФ и НАДФ·Н из неорганического фосфора, АДФ и НАДФ⁺. Процессы фотофосфорилирования являются конечной стадией собственно фотосинтеза, т.к. АТФ и НАДФ·Н представляют собой универсальную биологическую валюту, которая может синтезироваться не только в процессах фотосинтеза.

Рост микроводорослей происходит за счет биосинтеза органического вещества из биогенных элементов (минеральных солей и углекислоты), поступающих в клетку с водой. Энергетически процесс биосинтеза обеспечивается за счет превращения АТФ и НАДФ·Н в АДФ и НАДФ⁺, которые затем участвуют в реакциях фотофосфорилирования. В целом процесс синтеза биомассы у микроводорослей аналогичен процессам у других организмов и особенно близок к биосинтетическим процессам бактерий, например, хемоавтотрофов.

Таким образом, рост микроводорослей определяется процессами фотобиосинтеза (или сопряженными процессами фотосинтеза и биосинтеза), а кинетика процессов, в свою очередь, зависит от внешних и внутренних потоков энергетического и пластического субстрата.

2.1. 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 вычлениить из общего процесса, поэтому 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:

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

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

$$P_0 = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 = \sum_{k=1}^{k=n} P_0^k = \sum_{k=1}^{k=n} \frac{dB_0^k}{dt}.$$

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

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

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

$$P = P_0 - P_r,$$

или

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

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 [6] представляет собой величину скорости роста, нормированную относительно биомассы. Т.е. удельная скорость роста показывает, сколько единиц биомассы синтезирует каждая единица биомассы в единицу времени:

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

Или

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

Обозначим удельную скорость синтеза биомассы через (μ_0):

$$m_0 = \frac{1}{B} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)_0,$$

тогда

$$m = m_0 - m_r.$$

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

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

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:

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

В случае деления клетки на две дочерних:

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

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

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

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):

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

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

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

2.2. Накопительная (периодическая) культура микроводорослей

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 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.

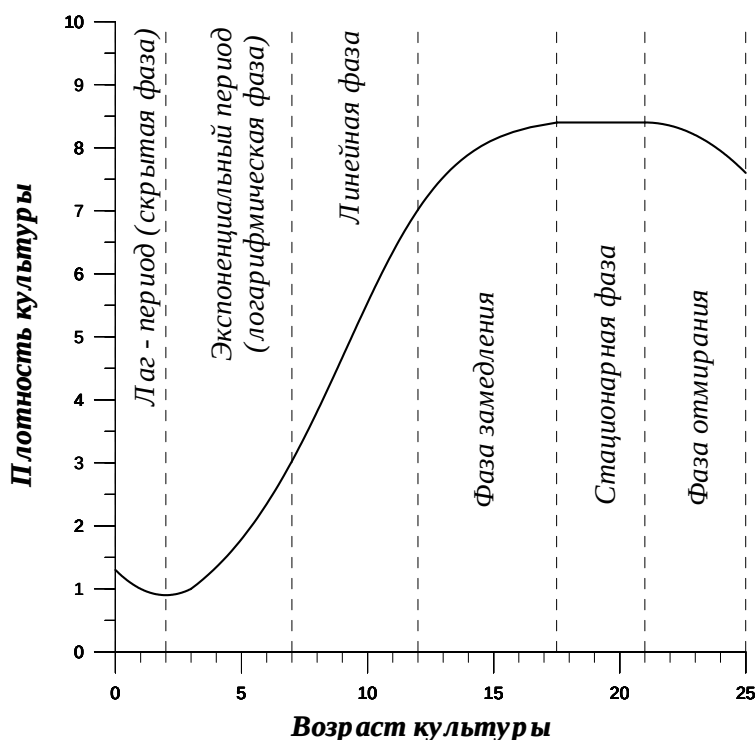


Рис. 1. Динамика накопления биомассы или концентрации клеток в периодической культуре микроводорослей. Штриховыми линиями обозначены условные границы между фазами роста культуры

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

Лог-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. Этот период характеризуется постоянством удельной скорости роста. Следовательно, для логарифмической фазы роста применима зависимость плотности культуры от времени, которую мы получили ранее для неограниченного роста биомассы:

$$B = B_{ln} \cdot \exp^{m \cdot t},$$

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

Фаза линейного роста. Практически всегда на кривой роста микроводорослей можно выделить прямолинейный участок. Это указывает на постоянство скорости роста (продуктивности культуры, $P = P_m = \text{const}$). Уравнение роста для линейной фазы:

$$B = B_l + P_m \cdot t.$$

Здесь B_l – плотность культуры в начале линейной фазы.

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

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

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

$$m = \frac{P}{B} = \frac{P}{B_l + P_m \cdot t}.$$

Фаза замедления роста. Чаще всего фаза замедления роста у микроводорослей характеризуется неустойчивостью, при этом в конце фазы наблюдаются скачки плотности культуры. В связи с этим трудно определить изменения скорости роста, но скорости роста на этом участке накопительной кривой уменьшаются до нуля.

Стационарная фаза. Характеризуется прекращением роста микроводорослей. Культура достигает максимальной плотности, 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 этой фазе 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.

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.

3. ХОД РАБОТЫ

Группа разбивается на 4 подгруппы по 3 человека. Двум подгруппам выделяется 2 фотобиореактора с определенным видом микроводорослей, причем освещенность поверхности фотобиореакторов разная.

Целью курсовой работы является исследование роста накопительной культуры микроводорослей при различной обеспеченности световой энергией.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Построить накопительную кривую роста – зависимость биомассы от времени (не менее 6 измерений).

Замечание. Для определения величины биомассы значение оптической плотности D_{750} необходимо умножить на заданный коэффициент.

2. Построить график зависимости числа клеток от времени.

3. Построить график зависимости сырого веса от времени.

4. Определить кинетические характеристики роста культуры – максимальную удельную скорость роста и максимальную продуктивность для экспоненциальной и линейной фазы роста соответственно.

5. Построить график изменения содержания хлорофилла в процессе роста культуры – зависимость $(D_{680} - D_{750})/D_{750}$ от времени.

Замечание. Для определения хлорофилла a соотношение $(D_{680} - D_{750})/D_{750}$ необходимо умножить на эмпирический коэффициент.

6. Построить график зависимости $(D_{630} - D_{750})/D_{730}$ от времени.

7. Для каждой экспериментальной точки определить поверхностную освещенность фотобиореактора, pH культуральной среды. Построить графики зависимости pH культуральной среды от времени.

8. Для каждой экспериментальной точки определить спектр культуры микроводорослей.

9. Для каждой экспериментальной точки по спектру культуры определить коэффициент поглощения и долю поглощенной световой энергии световой энергии.

10. Для каждой экспериментальной точки рассчитать КПД фотобиосинтеза.

4. АНАЛИЗ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

4.1. Методика определения оптической плотности на КФК-2

Методика описывает процедуру измерения ослабления светового потока суспензией нативной культуры микроводорослей на длине световой волны 750 нм в единицах оптической плотности.

Сущность метода.

Суспензию нативной культуры низших фототрофов помещают в кварцевую измерительную кювету концентрационного фотоэлектроколориметра и измеряют величину пропускания относительно кюветы с непоглощающим раствором (дистиллированной водой). Оптическая плотность суспензии микроводорослей на длине волны 750 нм (D_{750}) – это десятичный логарифм коэффициента пропускания T суспензии на длине волны 750 нм, взятый со знаком "минус".

Теоретическое введение.

Закон Бугера – Ламберта устанавливает зависимость количества монохроматического света, поглощенного веществом, от толщины поглощающего слоя:

$$I = I_0 \cdot e^{-k_l \cdot l},$$

где I_0 – интенсивность плоской монохроматической световой волны, падающей на слой вещества; I – интенсивность плоской монохроматической световой волны на выходе из слоя; e – основание натурального логарифма; l – толщина слоя (см); k_l – показатель поглощения света веществом (см^{-1}). Значение k_l зависит как от длины световой волны, так и от химической природы и состояния вещества.

Для разбавленных растворов поглощающего вещества в непоглощающем растворителе справедлив закон Бера, устанавливающий прямую пропорциональность между поглощением света веществом (k_l) и концентрацией этого вещества в растворе (c):

$$k_l = \kappa_l \cdot c.$$

Объединяя законы Бугера – Ламберта и закон Бера, получим обобщенный закон Бугера – Ламберта – Бера:

$$I = I_0 \cdot e^{-\kappa_l \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot e^{-D_m}.$$

Здесь κ_l – постоянная, зависящая от свойств растворенного вещества и длины волны света; c – концентрация растворенного вещества; l – толщина поглощающего слоя. Размерность величины κ_l зависит от выбора единиц измерения концентрации c . Например, если c измеряется в г/л, то величина κ_l имеет размерность л/(г·см). Безразмерная величина D_m называется *оптической толщиной (толщей)* и выражается в единицах оптической толщи (ед. опт. толщ.). Отношение интенсивности прошедшего света к интенсивности падающего называется *пропусканием* и выражается в долях или процентах:

$$T = \frac{I}{I_0}.$$

Между оптической толщиной и пропусканием существует связь:

$$D_m = -\ln T.$$

На практике более удобна запись закона Бугера – Ламберта – Бера с логарифмом по основанию 10, поскольку ослабление света измеряется в единицах кратных десяти, а не иррациональному числу e . В этом случае запись закона Бугера – Ламберта – Бера имеет вид

$$I = I_0 \cdot 10^{-D},$$

$$D = -\lg T,$$

где D – оптическая плотность, ед. опт. плотн. Оптическая плотность и оптическая толщина связаны между собой соотношением

$$D = \lg e \cdot D_m = 0,4343 \cdot D_m$$

В случае рассеяния света в оптически неоднородной среде закон ослабления светового пучка аналогичен закону Бугера – Ламберта:

$$I = I_0 \cdot 10^{-d_1 l},$$

где d_1 – показатель рассеяния, зависящий от длины волны света, размера рассеивающих частиц, показателей преломления частиц и среды в которой они взвешены (см^{-1}); l – толщина слоя рассеивающей среды (см). Если рассеивающая среда, кроме того, поглощает свет, то закон ослабления монохроматического пучка света аналогичен закону Бугера-Ламберта:

$$I = I_0 \cdot 10^{-(k_1 + d_1)l} = I_0 \cdot 10^{-e_1 l},$$

где k_1 – показатель поглощения; d_1 – показатель рассеяния; $e_1 = k_1 + d_1$ – показатель ослабления (экстинкции).

В клетках микроводорослей основная доля поглощённого света приходится на фотосинтетические пигменты. Помимо этого, свет поглощают и структурные элементы клеток – внутриклеточные компоненты, клеточные мембраны и пр. Поглощение света структурными элементами клеток, не связанное с пигментами, называется *неспецифическим*.

Рассеяние света в суспензии происходит вследствие дифракции первичного светового пучка из-за чрезвычайной гетерогенности клеток. При необходимости получить именно величину поглощения суспензии клеток используют прибор со специальной приставкой – фотоинтегрирующей сферой, – направляющей рассеянные лучи на регистрирующий элемент.

Прибор.

Концентрационный фотоэлектроколориметр КФК-2 (Загорский оптико-механический завод), абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышает 1,0 %, размах показаний, определяющий случайную погрешность, не превышает 0,3 %. Кюветы стеклянные 0,5 см.;

Измеряемые величины.

Коэффициент пропускания (ослабления) суспензии нативной культуры микроводорослей на длине волны 750 нм, T_{750} .

Процедуры.

Типовой анализ проводился в несколько этапов:

1. Отбор пробы;
2. Подготовка пробы;
3. Измерение коэффициента пропускания суспензии низших фототрофов на 750 нм;
4. Вычисление результатов.

Время между отбором пробы и измерением должно быть минимальным (не более 5 - 7 мин).

Отбор пробы.

Суспензию в фотобиореакторе тщательно перемешивают и отбирают аликвоту в пробирку. Объём аликвоты должен составлять не менее 5 мл.

Подготовка пробы.

Непосредственно перед измерением для плотных культур требуется подготовка пробы, которая состоит в разбавлении определенного объёма суспензии микроводорослей дистиллированной водой с последующим пересчётом результатов измерений. Соотношение подбирают таким образом, чтобы результат измерений коэффициента пропускания попадал в диапазон минимальной погрешности используемого прибора.

После разбавления суспензии приступают к измерению величины пропускания. Во избежание каких-либо проявлений агглютинации клеток при разбавлении следят за тем, чтобы различие температур добавляемой воды и суспензии в пробе составляло не более 5 градусов.

Измерение доли пропускания суспензии микроводорослей.

Измерения проводят при 750 нм, используя стеклянные кюветы 0,5 см, входящие в комплект поставки прибора. В первую очередь проводят измерение "холостой пробы" с целью проверки показания нулевого значения (нуля прибора). В измерительную кювету и кювету сравнения заливают дистиллированную воду, затем проводят измерение T_{750} . Показание прибора должно быть 0 %. При необходимости с помощью регуляторов грубой и тонкой настройки следует довести показания до отметки 0 %, после чего можно проводить измерение пробы. В кювету сравнения заливают дистиллированную воду. Непосредственно перед измерением подготовленной пробы её тщательно перемешивают встряхиванием, после чего заливают в измерительную кювету. Здесь важно, чтобы между измерением и перемешиванием время оставалось минимальным – это уменьшает ошибки измерений связанные с оседанием культуры на дно кюветы. При измерении кюветы устанавливают в максимальной близости к фотопрёмнику, что позволяет значительно снизить ошибки измерения, связанные с рассеянием света суспензией микроводорослей.

Вычисление и выражение результатов.

Поскольку оптическая плотность и пропускание связаны соотношением $D = -\lg T$, для вычисления конечного результата используют следующее выражение:

$$D_{750} = (-\lg T_{750}^{проб}) \cdot k,$$

где D_{750} – оптическая плотность; $T_{750}^{проб}$ – доля пропускания суспензии при 750 нм; k – коэффициент разбавления при подготовке пробы.

4.2. Методика измерения спектра ослабления суспензии нативной культуры микроводорослей в области ФАР

Область применения.

Методка описывает процедуру измерения спектра ослабления светового потока суспензией нативной культуры низших фототрофов (например, микроводорослей) в единицах оптической плотности в области фотосинтетически активной радиации (ФАР).

Сущность метода.

Фотосинтетические пигменты, содержащиеся в клетках низших фототрофов, поглощают падающий свет избирательно, т. е. количество поглощённого света зависит от его длины волны.

Сущность методики.

Суспензию нативной культуры низших фототрофов помещают в кварцевую измерительную кювету спектрофотометра и измеряют величину ослабления (пропускания) относительно кюветы с непоглощающим раствором – дистиллированной водой.

Теоретическое введение (см. методику измерения оптической плотности).

Прибор.

- Автоматически регистрирующий двулучевой спектрофотометр для абсорбционных измерений Specord UV-VIS (Karl Zeiss, Германия). Разрешающая способность прибора 20 см^{-1} по нониусу. Относительная погрешность измерения величины пропускания не более $\pm 0,5 \%$. Набор кварцевых кювет, входящий в комплект поставки прибора.

- Автоматически регистрирующий СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Спектральный диапазон: 200 – 1100 нм. Диапазон измерений спектральных коэффициентов направленного пропускания: 1 – 100 % с абсолютной погрешностью не более 1 %. Предел допускаемого значения среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности спектрофотометра при измерении спектральных коэффициентов направленного пропускания: 0,2 %. Набор кварцевых кювет, входящий в комплект поставки прибора.

Типовой анализ проводится в несколько этапов:

1. Отбор пробы;
2. Подготовка пробы;
3. Измерение спектра ослабления суспензии низших фототрофов в области ФАР.

Время между отбором пробы и измерением должно быть минимальным (не более 5 - 7 мин).

Отбор пробы.

Суспензию в фотореакторе тщательно перемешивают и отбирают аликвоту в пробирку. Объем аликвоты должен составлять не менее 5 мл.

Использование спектрофотометра СФ-2000.

Ниже описан порядок работы с прибором, дано описание программного обеспечения и настройки параметров спектрофотометра. Также приведена краткая рабочая инструкция.

Порядок работы.

1. Включить компьютер и спектрофотометр (при этом должен загореться светодиод, расположенный на передней панели спектрофотометра).
2. Через 3 - 5 минут загрузить программу СФ-2000.
3. После загрузки исполняемого файла на экране монитора появляется окно-приглашение к началу работы, в которое могут быть введены с клавиатуры данные об операторе, работающем с прибором.

4.3. Методика подсчета клеток в камере Горяева

Камера представляет собой стеклянную пластинку (рис. 2, а) с отделенной с помощью поперечных желобков средней частью. Высота средней части на 0,1 мм ниже, чем для всей пластинки, благодаря чему при накрывании покровным стеклом в центре пластинки создается камера (см. рис. 2, б).

На поверхности средней части пластинки нанесена сетка (см. рис. 2, в) с известной площадью квадратов. Каплю культуры наносят на сетку и прикрывают покровным стеклом. Покровное стекло тщательно притирают (для лучшего притирания на боковые поверхности стеклянной пластинки наносят небольшие капли суспензии). После притирания всю лишнюю жидкость вокруг покровного стекла и в желобках осторожно удаляют фильтровальной бумагой или марлей. Под микроскопом подсчитывают в определенном числе квадратов количество клеток водорослей и затем, зная площадь поверхности и высоту камеры, делают пересчет числа клеток на 1 мл суспензии (см. ниже пример расчета).

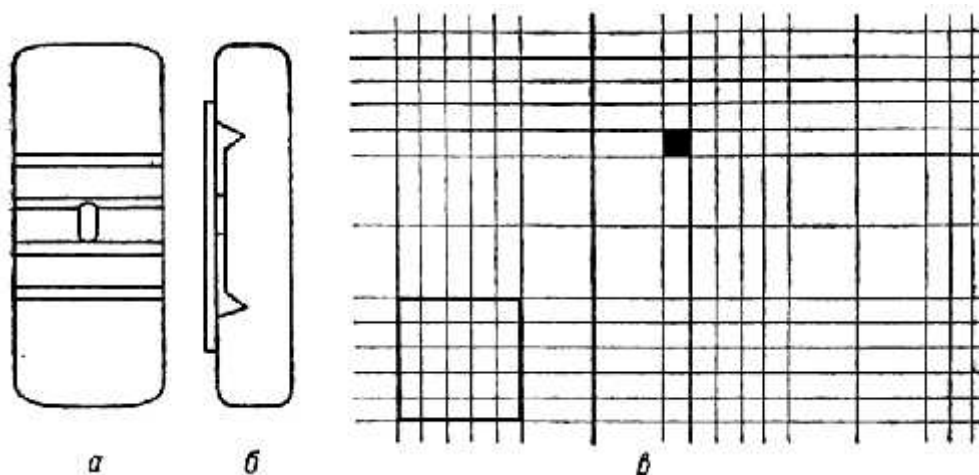


Рис. 2. Счетная камера Горяева: а) общий вид, б) вид сбоку, в) сетка, с помощью которой проводится подсчет клеток

При подсчете числа клеток в большинстве случаев бывает необходимо развести суспензию в 50, 100, 250 раз и так далее, чтобы в камере вести подсчет при плотности клеток $1,0 - 2,0^{10^6} / \text{см}^3$. Подсчет сила клеток непосредственно в плотных суспензиях дает меньшую точность и более трудоемок.

При подсчете в камере следует избегать следующих ошибок:

1. Взятую в пипетку суспензию (каплю) необходимо очень быстро нанести на поверхность сетки, пока клетки не успели осесть в нижней части пипетки.

2. Нанесенную на поверхность сетки каплю следует быстро накрыть покровным стеклышком и притереть его во избежание оседания клеток из капли, большей по объему, чем объем капли в камере после притирания стекла.

3. После притирания покровного стекла и при подсчете под микроскопом необходимо следить за тем, чтобы жидкость под покровным стеклом была распределена равномерно.

4. Окончив подсчет, камеру следует сразу же тщательно вымыть и протереть мягкой фланелью.

5. Для точного подсчета необходимо просчитывать большое количество квадратов (лучше всю сетку) и обязательно проводить повторные просчеты нескольких капель той же суспензии. Многие камеры сделаны с двумя сетками, разделенными желобками. В таких камерах можно сразу наносить и подсчитывать две капли. При этом следует обратить внимание на то, чтобы капли наносились не подряд из одной и той же пробы в пипетке, а при двукратном взятии суспензии в пипетку.

Пример расчета. При работе с камерой удобно подсчитывать число клеток в 25 больших квадратах. Согласно паспортным данным камеры, сторона большого квадрата составляет 0,2 мм, глубина камеры – 0,1 мм. Тогда объем одного большого квадрата составит $V = 0,2^2 \cdot 0,1 = 0,004 \text{ мм}^3 = 4 \cdot 10^{-6} \text{ мл}$, а объем всей камеры $V_{\text{камеры}} = 25 \cdot 4 \cdot 10^{-6} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ мл}$. Подсчитав количество клеток в 25 больших квадратах, можем найти количество клеток в 1 мл:

$$x = m \cdot 10^4 \text{ клеток/мл.}$$

4.4. Методика определения оптической плотности с помощью датчика

Датчик оптической плотности состоит из цилиндра с зеркальными стенками, сверху которого расположен источник света (светодиод заданной длины волны), а снизу – фотоприемник, подключенный к миливольтметру.

Принцип действия датчика – при прохождении света через суспензию микроводорослей часть энергии поглощается клетками (см. методику определения оптической плотности), часть рассеивается, часть попадает на фотоприемник. Рассеянный свет отражается от зеркальных стенок цилиндра и также попадает на фотоприемник.

Порядок работы с датчиком.

1. Источники света (светодиоды 630 и 730 нм) необходимо прогреть не менее 5 мин.

2. Налить в цилиндр 5 мл дистиллированной воды, опустить в цилиндр источник света, определить "нулевые" показания вольтметра U_0 .

Замечание. При измерении U_0 источник света располагать так, чтобы показания вольтметра были максимальны.

3. Слить дистиллированную воду, капли воды из цилиндра удалить фильтровальной бумагой, залить в цилиндр 5 мл измеряемой суспензии микроводорослей, опустить в цилиндр источник света, определить показания вольтметра $U_{\text{пробы}}$.

Замечание. При измерении $U_{\text{пробы}}$ источник света располагать так, чтобы показания вольтметра были максимальны.

4. Отношение $U_0/U_{\text{пробы}}$ показывает сколько процентов от падающего света попадает на фотоприемник, т.е. является величиной пропускания T , которая связана с оптической плотностью культуры микроводорослей (см. методику определения оптической плотности).

4.5. Методика определения сырого (сухого) веса

1. Определить на аналитических весах массу центрифужной пробирки.
 2. Отобрать в 2 - 4 пробирки по 5 мл суспензии микроводорослей.
 3. Установить пробирки с суспензией в центрифугу напротив друг друга.
 4. Включить центрифугу на 7 тыс. оборотов в минуту. Определить центробежное ускорение, действующее на нижний конец пробирки.
 5. После 5 мин центрифугирования слить надосадочную жидкость обратно в фотобиореактор.
 6. Оставшиеся капли осторожно, не касаясь биомассы на дне пробирки, удалить фильтровальной бумагой.
 7. Определить на аналитических весах массу пробирки с биомассой.
 8. Рассчитать величину сырой биомассы в граммах на 1 литр культуры.
- Для определения сухого веса пробирки с сырой биомассой положить в сушильный шкаф при температуре 105 градусов Цельсия на 1 сутки, взвесить пробирки после высыхания.

4.6. Методика определения коэффициента поглощения световой энергии и КПД фотобиосинтеза

Область и диапазон применения. В большинстве вопросов интенсивного культивирования низших фототрофов связанных с получением биомассы заданного биохимического состава (либо заданной энергетической ценности биомассы) возникает необходимость расчёта КПД фотобиосинтеза. Также немаловажным является учёт КПД фотобиосинтеза при разработке систем культивирования, расчёта производительности системы культивирования, при использовании различного рода источников облучения суспензии клеток и т. п. Для низших фототрофов предложенный метод применим при соблюдении следующих условий культивирования: фотосинтезирующие клетки низших

фототрофов равномерно распределены по всему рабочему объему культиватора, клетки перемешиваются и не образуют скоплений, сгустков и пр., непрерывная культура низших фототрофов находится в стационарном динамическом равновесии, т. е. рост не лимитирован, все удельные скорости равны, кроме того, неизменными остаются спектральные характеристики клеток.

Теоретическое введение. КПД фотобиосинтеза есть отношение двух величин: запасённой (E_x) и поглощённой световой энергии (E_n):

$$КПД = \frac{E_x}{E_n} \cdot 100\% . \quad (1)$$

Величина E_x определяется произведением прироста биомассы X и её калорийностью R , т.е.

$$E_x = R \cdot X = R \cdot P \cdot V ,$$

где P – продуктивность или абсолютная скорость роста, г/(л*сут); V – рабочий объем культуры, л.

Таблица 1. Калорийность биомассы *S. Platensis*

Компонент	Содержание в биомассе, %	Калорийность 1 г.с.б., ккал	Калорийность 100 г.с.б., ккал
Жиры	6	9,3	$6 * 9,3 = 55,8$
Белки	64	5,6	$64 * 5,6 = 358,4$
Углеводы	20	4,2	$20 * 4,2 = 84,0$
Зола	10	0	$10 * 0 = 0$
Калорийность 100 г.с.б.:			$S = 498,2$

Для определения количества поглощённой световой энергии используется закон Бугера – Ламберта – Бера, который представляется как

$$I = I_0 \cdot 10^{-D}, \frac{I}{I_0} = 10^{-D}, -\lg(T) = D .$$

Разница между входящим и выходящим световым потоком и будет поглощенной частью при данной длине волны:

$$I_{\Pi} = I_0 - I .$$

Разделив обе части равенства на I_0 , запишем коэффициент поглощения a_{sp} для соответствующей световой волны:

$$a_{sp} = \frac{I_0 - I}{I_0} = 1 - T .$$

Для разных длин волн светового потока величина a_{sp} зависит от спектра культуры. Поэтому, чтобы найти суммарную величину, необходимо просуммировать значения a_{sp} для каждой длины волны из области ФАР:

$$a_{sp} = \int_{400}^{700} a_{sp}(\lambda) d\lambda .$$

Поглощённую энергию, с учётом площади освещаемой поверхности S , получим, перемножая величину интенсивности поверхностной радиации и коэффициент поглощения:

$$E_n = E_0 \cdot a_{sp} \cdot S.$$

Подставляя значения E_x и E_n в (1) найдём искомую величину КПД фотобиосинтеза.

5. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Основные термины и понятия.
2. Какими факторами определяется наличие той или иной фазы роста накопительной культуры?
3. Чем определяется скорость роста культуры микроводорослей, удельная скорость роста, средняя удельная скорость роста?
4. Из каких основных биохимических компонентов состоит биомасса микроводорослей? Как может изменяться биохимический состав клеток микроводорослей в процессе роста накопительной культуры?
5. Почему в процессе роста плотности культуры происходит увеличение рН культуральной среды? Чем определяется рН культуральной среды?
6. Закон Бугера – Ламберта – Бера.
7. Почему в процессе роста происходит изменение спектра поглощения культуры?
8. Изменяется ли КПД фотобиосинтеза в процессе роста накопительной культуры?

БИОКИНЕТИКА

*Методические указания
по выполнению курсовой работы*

Составители: **Лелеков** Александр Сергеевич,
Воронин Дмитрий Петрович, **Гаврилов** Петр Евгеньевич

Редактор - О.В. Дмитриева

Изд. № 2/18. Объем 2,5 п.л.
РИИЦМ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»