

ИЗМЕРЕНИЕ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУР ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ.

Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г.

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского» РАН

г. Севастополь, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2020

Аннотация. Обсуждается проблема измерения плотности культур диатомовых водорослей. Получены коэффициенты перехода между различными методами измерения плотности диатомовых водорослей на примере *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. Показаны достоинства и недостатки всех методов оценки плотности культур диатомовых водорослей. В данной работе также указаны пределы применимости всех методов оценки биомассы диатомей.

Ключевые слова: методы измерения плотности, диатомовые водоросли, *C. closterium*.

Ключевым параметром во многих исследованиях является плотность культуры, которую обычно представляют как концентрацию клеток или сухую массу в единице объема. В литературе приводятся разные методы измерения плотности культур диатомовых водорослей: оптический, весовой метод, метод окисляемости биомассы и прямой подсчет клеток [1-3]. Использование разных методов измерения плотности диатомовых водорослей приводит к трудностям при сопоставлении значений разных единиц измерения. Актуальной задачей является установить взаимосвязь между результатами измерений плотности культур различными методами. Особенно важной проблемой является измерение плотности бентосных культур микроводорослей. Это связано с тем, что удельная плотность у биомассы бентосных водорослей больше единицы, поэтому клетки достаточно быстро оседают на дно культиватора, что создает трудности отбора проб для измерений. Среди всех диатомовых водорослей можно выделить бентосную диатомею *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin, уникальную по биохимическим и продукционным характеристикам [4-6].

Цель данного исследования сравнить различные методы оценки плотности культуры микроводорослей и рассчитать коэффициенты перехода между результатами измерений плотности различными методами для *C. closterium*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения цели был поставлен ряд экспериментов с проточной и накопительной культурой *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin из коллекции культур ИнБЮМ РАН. Альгологически чистую культуру во всех экспериментах выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объемом 2 л, слоем 5 см на питательных средах F [7] и RS [6] при постоянной температуре суспензии $20 \pm 1^\circ\text{C}$ и при круглосуточном освещении. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1,1 л воздуха на 1 л культуры в мин) посредством компрессорной установки.

Плотность культуры определяли четырьмя методами: 1) методом йодатной окисляемости [8]; 2) прямым взвешиванием сырой массы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках в десяти повторностях на аналитических весах с погрешностью 0,1 мг после осаждения клеток центрифугированием (1600 g в течение 2 мин); 3) методом измерения оптической плотности культуры на длине волны 750 нм с использованием фотоэлектродиметра КФК-2 (кювета 0,5 см) [9]; 4) подсчет численности клеток в камере Горяева [10].

При подсчете численности клеток камеру и покровное стекло насухо протирали марлей, аккуратно притирали покровное стекло к камере, заполняли камеру суспензией микроводорослей и подсчитывали численность клеток внутри большого квадрата камеры. Камера Горяева представляет собой пластину с нанесенной сеткой с известной площадью квадратов. При работе с камерой принято досчитывать количество клеток в 25 больших квадратах, каждый из которых состоит из 16 маленьких. Следовательно, если общая сумма клеток в 25 больших квадратах равняется m , то в одном маленьком квадратике число клеток будет соответственно $n = m / 16 \cdot 25$, а в 1 см^3 количество клеток составит $x = n \cdot 10^6 = (4m / 16 \cdot 25) \cdot 10^6 = (m / 100) \cdot 10^6$

Таким образом подсчет клеток в 25 больших квадратах (в 1 см^3 суспензии) рассчитывали по формуле [10]:

$$X = m \cdot 10^{-4}, \quad (1)$$

где X – число клеток в 1 см^3 , тыс.кл·мл⁻¹; m – общая сумма клеток в 25 больших квадратах.

При оценки плотности культуры оптическим методом использовали колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2. Выбор КФК-2 обоснован тем, что в сравнении с другими приборами скорость измерения плотности на КФК-2 достаточно высока. Это позволяет минимизировать ошибку измерений, связанную с оседанием клеток на дно кюветы. Особенно это актуально для бентосных диатомей, у которых плотность биомассы больше плотности воды, поэтому за короткое время их клетки оседают на дно кюветы. Пробы, у которых оптическая плотность выше единицы предварительно разбавляли морской водой, подбирая

Таблица 1. Экспериментальные данные по расчёту плотности культуры *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann в единицах сырой массы

Масса пробирки с сырой биомассой, г	Сырая биомасса, г·10мл ⁻¹	Сырая биомасса г·л ⁻¹	Сухая биомасса г·л ⁻¹
3,8292	0,3285	32,85	3,28
3,7579	0,3157	31,57	3,15
3,8391	0,3375	33,75	3,38
3,8639	0,2998	29,98	2,99
3,8487	0,3351	33,51	3,35
3,7487	0,3069	30,69	3,07
3,725	0,3338	33,38	3,34
3,8214	0,3224	32,24	3,22
3,7541	0,3298	32,98	3,30
3,7133	0,3134	31,34	3,13
Среднее значение =		32,22	3,22
Среднее квадратичное отклонение (СКО) =		1,29	0,13
Коэффициент вариации, %		3,99	3,99

коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-2 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2-0,6 единиц). При определении плотности культуры методом прямого взвешивания биомассы десять сухих полипропиленовых пробирок предварительно взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,1 мг. Анализируемые пробы суспензии *C. closterium* объемом 10 мл отбирали из фотобиореактора в данные пробирки с помощью дозатора. Затем суспензию центрифугировали при 3000 об·мин⁻¹ две минуты и удаляли надосадочную жидкость. Оставшиеся капли влаги на стенках пробирок удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Пробирки с биомассой взвешивали на аналитических весах. Учитывая объём аликвоты и долю воды в сырой массе, по разнице весов пробирок с биомассой и без биомассы рассчитывали плотность культуры в фотобиореакторе:

$$B = (m_{\text{пробы}} - m_{\text{пробирки}}) \cdot 1000 / V, \quad (2)$$

где B – плотность культуры в суспензии, г сырой массы на литр; $m_{\text{пробы}}$ – масса полипропиленовой пробирки с сырой биомассой, г; $m_{\text{пробирки}}$ – масса пустой пробирки, г; V – объём аликвоты суспензии, отбираемой из фотобиореактора.

Таким образом, средняя квадратичная ошибка метода прямого взвешивания биомассы составляет 1,29 для сырой биомассы и 0,13 – для сухой. Коэффициент вариации – 3,99 %.

Необходимо обратить внимание, что при использовании метода прямого взвешивания биомассу *C. closterium* не промывали, так как соли питательной среды заметного влияния не оказывали. Доля сухой биомассы в промытой и в не промытой буферным раствором сырой массе различались в 0,01.

Эталоном для сравнения значений плотностей разных видов культур считается один грамм сухой массы на литр, так как коэффициент перехода между сырой и сухой биомассы у каждого вида водорослей разный.

Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали экспериментальный коэффициент пересчёта между сухой и сырой массой ($k=0,1$, $n=10$). Для определения коэффициента пересчёта сначала отбирали аликвоты сырой биомассы и определяли сырую биомассу методом центрифужных пробирок, затем сырую биомассу переносили в предварительно взвешенные бюксы с точностью 0,0001 г. Бюксы помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 105°C в течение 24 часов. Через 24 часа бюксы помещали в эксикатор с силикагелем. Когда бюксы остыли до температуры воздуха помещения, в которой они находятся (примерно через 20–30 мин), каждый бюкс взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г [10].

Абсолютно сухую массу рассчитывали по формуле:

$$m_{\text{асм}} = m_{\text{навеска}} - m_{\text{бюкс}}, \quad (3)$$

где $m_{\text{навеска}}$ – масса бюкса с сухой биомассой микроводоросли, г; $m_{\text{бюкс}}$ – масса пустого бюкса, г

Коэффициент перехода между сухой и сырой биомассой (табл. 2) определяли по формуле:

$$K = \text{АСМ} / \text{СМ}, \quad (4)$$

где АСМ – абсолютно сухая масса микроводоросли, г; СМ – сырая масса микроводоросли, г

Таблица 2. Расчёт коэффициента К перехода между сухой и сырой биомассой *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann

Масса пробирки, г	Масса пробирки с сырой биомассой, г	Сырая масса, г	Масса бюкса, г	Масса бюкса с сухой биомассой, г	Сухая масса, г	Коэффициент К перехода между сухой и сырой биомассой
3,1661	3,3824	0,2163	13,4122	13,4356	0,0234	0,1082
3,4817	3,6975	0,2159	12,8740	12,8977	0,0237	0,1098
3,1598	3,3622	0,2024	13,6091	13,7226	0,0235	0,1161
3,5162	3,7509	0,2348	13,7794	13,8063	0,0269	0,1146
3,2854	3,4840	0,1986	13,4471	13,4713	0,0242	0,1219
3,5866	3,7876	0,2011	13,2693	13,2927	0,0234	0,1164
3,4907	3,6944	0,2037	13,2556	13,2732	0,0176	0,0864
3,6220	3,8257	0,2037	19,4793	19,5021	0,0228	0,1119
3,3655	3,5811	0,2156	19,9770	20,0014	0,0244	0,1131
3,3657	3,5776	0,2119	19,6077	19,6320	0,0243	0,1147
Среднее значение коэффициента К=						0,105
Среднее квадратичное отклонение (СКО) =						0,0132
Коэффициент вариации, %						11,9657

Коэффициент показывает долю абсолютно сухой биомассы в сырой биомассе. $1 - K$ — это доля воды в сырой биомассе.

Таким образом, средняя квадратичная ошибка при расчете коэффициента К перехода между сухой и сырой биомассой *Cylindrotheca closterium* методом прямого взвешивания биомассы составляет 0,013. Коэффициент вариации – 11,96 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В литературе обычно плотность диатомовых водорослей оценивают с помощью подсчёта клеток в камере Горяева, а также методом прямого взвешивания биомассы. Данные методы считаются прямыми и более точными, чем косвенные: оптический метод и метод окисляемости биомассы. Существенный недостаток прямых методов измерения – трудоёмкость и длительность измерения. Проблема оценки биомассы диатомовых водорослей за короткое время остро стоит при промышленном культивировании. Оптический метод оценки плотности культуры занимает несколько секунд и его можно использовать как экспресс метод оценки биомассы микроводорослей.

Найдём зависимость между прямым методом подсчёта численности клеток и оптическим методом. Для нахождения данной зависимости в данном исследовании используем экстенсивную культуру, т.е. культуру, выращенную на питательной среде F. Возможно также использование интенсивной культуры в стационарной фазе роста. Однако данную культуру необходимо разбавлять 10-15 раз морской водой, что нецелесообразно.

Для нахождения зависимости оптической плотности от концентрации клеток нежелательно использовать интенсивную культуру в экспоненциальной фазе роста. Данный факт обусловлен тем, что при приготовлении концентрированных питательных сред для интенсивного культивирования высокие концентрации солей кремневой кислоты образуют оптически активный гидрозоль в питательной среде, который способен также поглощать и рассеивать свет как и клетки микроводорослей, что приводит к большим погрешностям измерений при применении оптического метода оценки концентрации клеток.

Измерение оптической плотности экстенсивной культуры проводили ежедневно на длине волны 750 нм. Одновременно подсчитывали число клеток в камере Горяева. Зависимость оптической плотности от численности клеток представлена на калибровочном графике (рис. 1).

На рисунке 1 представлена линейная зависимость между оптической плотностью и численностью клеток с углом наклона 0,293.

Полученная линейная зависимость имеет большое практическое значение, поскольку позволяет исключить трудоёмкий подсчет численности клеток при исследовании культур диатомей. Зная оптическую плотность у *C. closterium*, можно определить концентрацию клеток по уравнению:

$$N = 3,41 * D_{750},$$

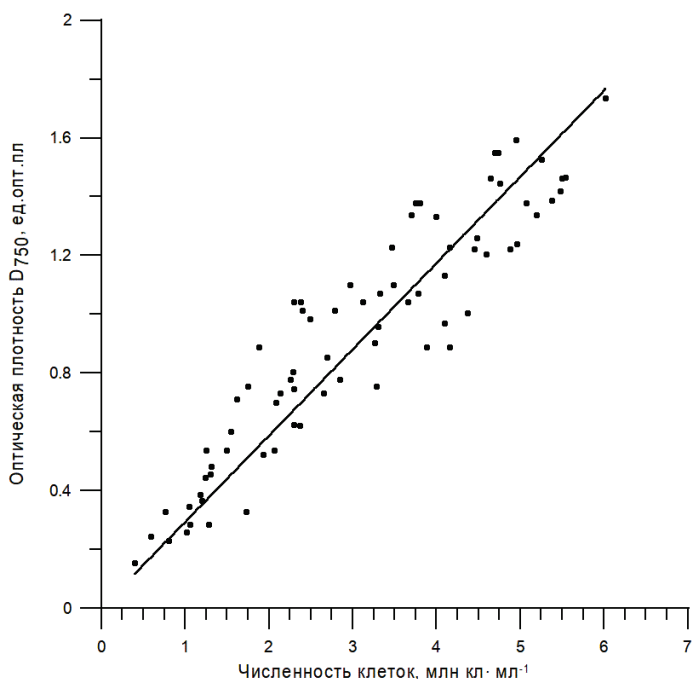


Рисунок 1. Зависимость оптической плотности культуры D_{750} от численности клеток N в культуре диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin

где N – численность клеток, млн кл мл^{-1} ; D_{750} – оптическая плотность при длине волны 750 нм.

Таким образом, для определения концентрации клеток использовали экспериментальный коэффициент перехода между оптической плотностью и численностью клеток $k=3,4$

Найдём зависимость между прямым методом взвешивания биомассы *C. closterium* и оптическим методом. Для установления данной зависимости используем интенсивную культуру в стационарной фазе роста. Метод прямого взвешивания биомассы и оптический метод не применимы для экспоненциальной фазы роста при интенсивном культивировании. Это связано с тем, что при интенсивном культивировании диатомей используется концентрированная питательная среда с высоким содержанием кремния. При этом из солей кремневой кислоты образуется оптически активный гидрозоль, который рассеивает свет при определении оптической плотности, а

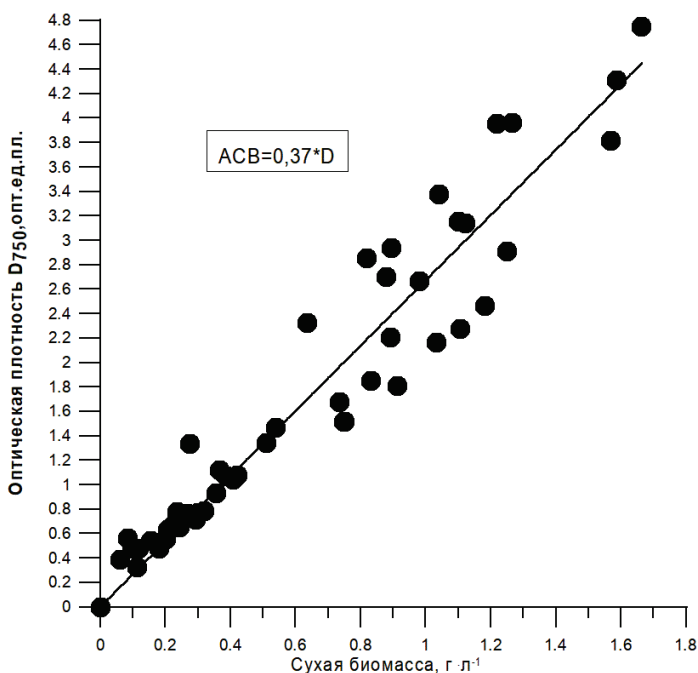


Рисунок 2. Параллельные измерения оптической плотности и сухой биомассы культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin

также при центрифугировании оседает на дно пробирки вместе с биомассой. Отметим также, что по этой же причине метод прямого взвешивания биомассы также не применим для экстенсивной культуры.

Для установления зависимости между оптической плотностью культуры и сухой биомассы измерение плотности интенсивной культуры *C. closterium* проводили ежедневно прямым взвешиванием с помощью центрифужных полипропиленовых пробирок в десяти повторностях в стационарной фазе роста и одновременно измеряли оптическую плотность культуры на длине волны 750 нм с помощью фотозлектроколориметра КФК-2 (кювета 0,5 см). Установлена линейная зависимость оптической плотности культуры от сухой биомассы (рис. 2).

Полученная линейная позволяет исключить трудоёмкий метод прямого взвешивания биомассы при исследовании культур диатомей. Зная оптическую плотность у *C. closterium*, можно сухую биомассу по уравнению:

$$C = 0,37 * D_{750},$$

где C – сухая биомасса *C. closterium*, г л⁻¹; D_{750} – оптическая плотность при длине волны 750 нм

Таким образом, для расчета сухой массы использовали экспериментальный коэффициент перехода между оптической плотностью и сухой массой $k=0,37$.

Разные виды водорослей имеют разные размерные характеристики клеток, и на 1 грамм сухой биомассы разных видов культур бентосных водорослей приходится разное содержание численности клеток, что приводит к затруднению сравнивать биомассу разных культур по численности клеток. Поэтому целесообразно оценивать плотность культуры в единицах сухой биомассы. Данный факт подчеркивает важность второй калибровочной кривой.

Как было отмечено ранее в экспоненциальной фазе роста при интенсивном культивировании невозможно использовать оптический метод оценки плотности культуры, а также прямой метод взвешивания биомассы. Подсчёт численности клеток также затруднителен, так как при интенсивном культивировании *C. closterium* способна образовывать конгломераты. В данных условиях оценить плотность культуры возможно только разработанным нами ранее способом йодатной окисляемости [8].

Для оценки плотности культуры в экспоненциальной фазе роста на питательной среде RS использовали метод йодатной окисляемости [8]. После мокрого сжигания биомасса водоросли полностью растворялась. Определена прямопропорциональная зависимость между массой выделяющегося йода от массы водорослей, показана линейная зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе после мокрого сжигания биомассы от плотности культуры. Т.е. измеряя оптическую плотность растворённого йода в хлороформе, который выделился при мокром сжигании и умножая на калибровочный коэффициент можем определить плотность культуры в фотобиореакторе в граммах на литр (рис. 3).

Зольный остаток во всех стадиях накопительного роста культуры *C. closterium* составлял $32,5 \pm 0,5\%$ сухой массы. Для нахождения связи оптической плотности раствора йода в хлороформе при длине волны 510 нм и плотности культуры (биомассы культуры в одном литре среды) использовали условные средние измерений, поскольку среднее значение характеризуется меньшей дисперсией.

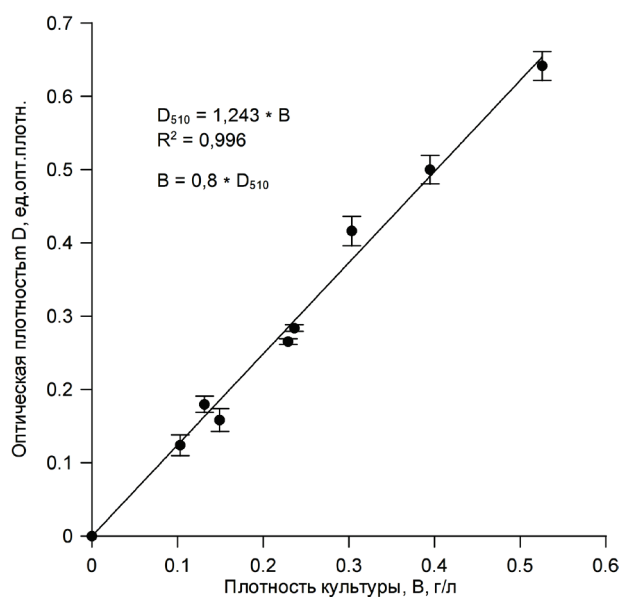


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе на длине волны 510 нм от плотности культуры *C. closterium* в биореакторе при мокром сжигании биомассы

ВЫВОДЫ

Показаны достоинства и недостатки всех методов оценки плотности культур диатомовых водорослей на примере *C. closterium*. Найдены коэффициенты перехода между различными методами измерения плотности культуры диатомовой водоросли *C. closterium*.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ государственной регистрации АААА-А18-118021350003-6)

Список литературы/References:

1. Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N. The carbon fixation efficiency in biomass of *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin (Bacillariophyceae) under the conditions of cumulative cultivation. *Marine Biological Journal*, 2020, vol. 5, iss. 1, pp. 12-19, DOI: 10.21072/mbj.2020.05.1.02.
2. Affan A., Neo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium*. *Journal of Phycology*, 2009, vol. 45, iss. 6, pp. 1405-1415.
3. Wang S., Verma S. K., Said I. H., Thomsen L., Ullrich M. S., Kuhnert N. Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. *Microbial Cell Factories*, 2018, vol. 17, article no. 110 (13 p.), DOI: 10.1186/s12934-018-0957-0.
4. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Репков А.П., Лелеков А.С. Промышленная технология производства биомассы морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin с использованием газовихревого фотобиореактора. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, № 1-1, с. 73-77. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Zozulya Yu.V., Uvarov I.P., Repkov A.P., Lelekov A.S. Industrial production technology biomass marine diatoms *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin using gas vortex photobioreactor. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, iss. 1-1, pp. 73-77. (in Russ.)]
5. Железнова С.Н. Продукционные характеристики морской диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin в интенсивной культуре при различных источниках азота в питательной среде. *Морской биологический журнал*, 2019, т. 4, № 1, с. 33-44. [Zheleznova S. N. Production characteristics of the diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin grown in an intensive culture at various nitrogen sources in the medium. *Marine Biological Journal*, 2019, vol. 4, iss. 1, pp. 33-44. (in Russ.)]. DOI: 10.21072/mbj.2019.04.1.04.
6. 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, № 3 (14), с. 46-48. [Zheleznova S.N., Gevorgiz R.G., Bobko N.I., Lelekov A.S. The culture medium for the intensive culture of diatomic alga *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – promising biotech facility. *Aktual'naya biotekhnologiya*, 2015, no. 3 (14), pp. 46-48. (in Russ.)]
7. Guillard R., Ryther J. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 1963, vol. 8, iss. 2, pp. 229-239.
8. 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. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Nikonova L.L., Bobko N.I., Nekhoroshev M.V. Assessment of the density of the culture of phototrophic microorganisms by the method of iodate oxidation. Sevastopol, 2015, 31 p., URL: <https://repository.marine-research.org/handle/299011/43>. (In Russ.)].
9. 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. [Gevorgiz R.G., Alisiyevich A.V., Shmatok M.G. Estimation of the biomass of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. by optical density of culture. *Ekologiya moray*, 2005, iss. 70, pp. 96-106. (in Russ.)].
10. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузьменко М.И., Козицкая В.Н., Величко И.М., Мыслович В.О., Гавриленко М.Я., Арендарчук В.В., Кирпенко Ю.А. Методы физиолого - биохимического исследования водорослей. Методы физиолого - биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наукова думка, 1975, с. 75-212. [Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F., Lukina L.F., Kuzmenko M.I., Kozitskaya V.N., Velichko I.M., Myslovich V.O., Gavrilenko M. Y., Arendarchuk V.V., Kirpenko Yu.A. Methods of physiological - biochemical study of algae. Methods of physiological - biochemical study of algae in hydrobiological practice. Kiev: Naukova Dumka, 1975, pp. 75- 212. (in Russ.)].

MEASUREMENT OF DIATOM CULTURES DENSITY BY VARIOUS METHODS

Zheleznova S.N., Gevorgiz R.G.

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

Abstract. The problem of diatom cultures density measuring is discussed. Transition coefficients between different methods for measuring the density of diatoms were obtained using the example of *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. The advantages and disadvantages of all methods for assessing the density of diatom cultures are shown. This work also indicates the limits of applicability of all methods for assessing the biomass of diatoms.

Key words: density measurement methods, diatoms, *C. closterium*.