

765. Фотобиореакторы располагались в плотную к лампам, средняя освещённость на поверхности обоих реакторов была одинаковой и составляла около 19 кЛк. Барботаж культуры осуществляли аквариумным компрессором типа CR-40R с двумя выходами (для двух фотобиореакторов), производительностью 3 л/мин и максимальным давлением 0,022 МПа. Скорость подачи воздуха была установлена на уровне 1 л на литр культуры в минуту. Значение температуры составляло 28 ± 2 °С. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали газо-воздушной смесью с 3 % по объёму углекислого газа с помощью компрессорной установки.

В экспериментах проводили измерение температуры, pH, оптической плотности суспензии. Перед проведением измерений в фотобиореакторы добавляли дистиллированную воду с целью компенсации испарения воды. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в культиваторе, абсолютная погрешность измерений составляла $\pm 0,5$ °С. Освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116. Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на КФК-2 при длине волны 750 нм, абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышала 1 %. Зольность культуры *T. viridis* составила 21 % от абсолютно сухой массы. При пересчёте единиц оптической плотности к органическому веществу (ОВ) использовали эмпирически определённый коэффициент 0,8.

При определении содержания общего белка культура была переведена в плотностатный режим культивирования [2], причем стационарные плотности были заданы от 0,4 до 1 г·л⁻¹. После того как культура адаптировалась к каждой плотности и наступало состояние стационарного динамического равновесия, проводился отбор проб для определения белков методом Лоури [3].

Результаты и обсуждения.

При накопительном режиме культивирования биохимический состав клеток микроводорослей постоянно изменяется из-за роста культуры и изменения условий среды. Например, уменьшается количество падающей энергии на клетку, снижается обеспеченность минеральным питанием. Все эти факторы в результате оказывают влияние на процессы, происходящие в клетках, что приводит к изменению содержания биохимических компонентов [4]. Непрерывный режим культивирования микроводорослей, а именно плотностат, характеризуется постоянством плотности культуры, скорости роста и условий среды. В работе проведена серия экспериментов в квазинепрерывном режиме культивирования, характеризующийся тем что задается вначале суток плотность культуры, например, 0,4 г·л⁻¹ и через 24 часа измеряется плотность культуры в конце суток. Период времени между разбавлениями устанавливается, в зависимости от относительной скорости прироста культуры. Промежуток времени между разбавлениями – сутки, коэффициент разбавления подбирался таким образом, чтобы плотность после разбавления достигла заданной величины [2]. Такие системы позволяют стабилизировать не только световое питание клеток, но и стабилизировать уровень их минерального питания, вплоть до их полного обеспечения энергией и элементами, и достигать максимальных значений скорости роста, ограниченных только внутренними видоспецифическими свойствами [5]. Данную процедуру повторяют до тех пор, пока суточный прирост культуры не становится постоянным. После того как культура микроводорослей по сухому весу ежедневно имела одинаковый прирост, проводили определение содержания белка в культуре *T. viridis*. Выше изложенная процедура повторяется для всех задаваемых начальных плотностей непрерывного режима выращивания микроводоросли *T. viridis*. Используемая среда для культивирования организмов рассчитана на получения плотности культуры до 5 г·л⁻¹, отсюда следует что рост водорослей в выбранном нами диапазоне плотностей не может быть лимитирован минеральным питанием. Это подтверждается тем, что продуктивность культуры для всех равновесных состояний была одинаковой и составляла 0,2 г·л⁻¹·сут⁻¹. В результате для первой стационарной плотности, когда нижняя граница плотности культуры задавалась 0,4 г·л⁻¹ содержание белка изменялось от 0,24 г·л⁻¹ до 0,26 г·л⁻¹. Для второго равновесного состояния, нижняя плотность культуры задавалась 0,5 г·л⁻¹ и содержание белка для данной плотности составляло от 0,27 до 0,28 г·л⁻¹. И аналогично для остальных вариантов опыта вплоть до равновесной плотности культуры 1,0 г·л⁻¹, при которой содержание белка составляло 0,36-0,37 г·л⁻¹. Таким образом, в то время, когда ростовые характеристики достигают стационарного динамического равновесия, содержание белка в культуре еще изменяется и достигает постоянных значений в нашем случае только через трое суток (см. рис. 1).

Можно предположить, что запаздывание выхода в стационарное динамическое равновесие содержания белка по сравнению с плотностью культуры в непрерывном режиме выращивания связано с так называемым принципом «узкого места». Гетерогенный характер организации биологических и биохимических процессов проявляется как в структурном, так и в динамическом отношении. Различные функциональные процессы, отдельные метаболические циклы сильно отличаются друг от друга по их характерным временам и скоростям. Даже в пределах одной отдельной цепи взаимосвязанных реакций всегда имеются наиболее медленные и наиболее быстрые стадии. Поэтому сложные биологические процессы хотя и включают большое число промежуточных звеньев, динамические свойства определяются отдельными наиболее медленными звеньями. [6]. Можно предположить, что «узким местом» метаболизма *T. viridis* в эксперименте являются процессы биосинтеза белка. И наглядно переходные процессы изменений метаболических процессов клеток микроводоросли проявляются через изменение содержания белка при смене режима культивирования, что представлено на рисунке 1. Зависимость содержания белка в культуре *T. viridis* от плотности представлена на рисунке 2. Можно заметить, что с ростом плотности культуры содержание белка увеличивается не линейно.

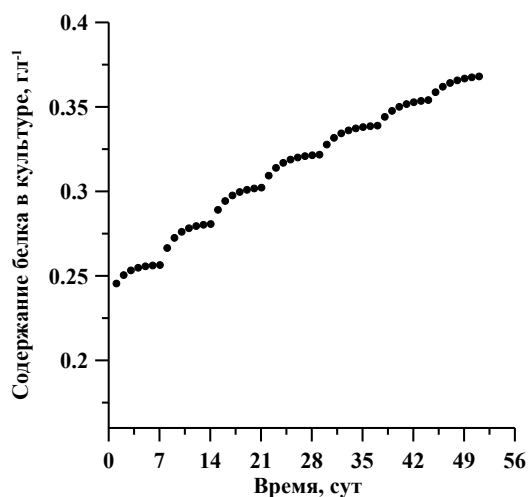


Рисунок 1 – Динамика содержания белка в культуре *Tetraselmis viridis* при непрерывном культивировании (расчетные данные)

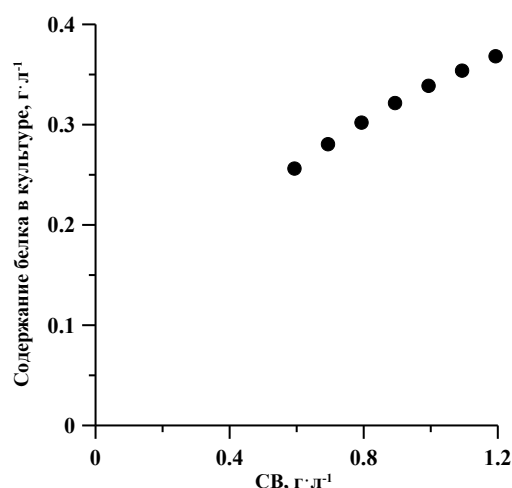


Рисунок 2 – Динамика содержания белка от плотности культуры в непрерывной культуре (экспериментальные данные)

Таким образом, экспериментально выявлена динамика содержания белка в непрерывной культуре *T. viridis* при смене режимов выращивания. Установлена эмпирическая зависимость между содержанием белка в культуре и плотностью непрерывной культуры *T. viridis*.

Список литературы / References:

1. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. *Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды*: монография. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011, 152 с. [Zavorueva E.N., Zavoruev V.V., Krym S.P., *The lability first photosystem phototrophic in different environments: a monograph*. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2011, 152 p. (In Russ.)]
2. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей 2. Квазинепрерывная культура. *Экология моря*, 2005, вып. 67, с. 98-110. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth 2. Quasyccontinuous culture. *Sea Ecology*, 2005, vol. 67, pp. 98-110. (In Russ.)]
3. Копытов Ю.Р., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Некхоросhev М.В., Новикова Т.М. The method of complex determining of biochemical composition of microalgae. *International Journal on Algae*, 2015, vol. 17, pp. 397-402.
4. Ризниченко Г.Ю. Математические модели первичных процессов фотосинтеза. *Итоги науки и техники ВИНТИ, серия «Биофизика»*, 1991, с. 160. [Riznichenko G.Yu. Mathematical model of primary photosynthetic processes. *Results of Science and Technology VINITI, a series of "Biophysics"*, 1991. p. 160. (In Russ.)]
5. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей 6. Предельные скорости роста. *Экология моря*, 2010, спец. вып. 80, с. 85-91. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth 6. Limits of growth rate. *Sea Ecology*, 2010, spec. vol. 80, pp. 85-91. (In Russ.)]
6. Рубин А.Б. Кинетика биологических процессов. *Соросовский образовательный журнал*, 1998, № 10, с. 84-91. [Rubin A.B. Kinetics of biological processes. *Soros Educational Journal*, 1998, no. 10, pp. 84-91. (In Russ.)]

ПРОТОЧНЫЙ ДАТЧИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Гаврилов П.Е., Азаров А.А., Лелеков А.С.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: havrilovpyotr@gmail.com

Аннотация. Определение оптической плотности – один из основных экспресс-методов определения биомассы культуры микроводорослей. Для этого широко используется метод спектрофотометрии. Этот процесс требует непосредственного отбора культуры, разведение пробы до нужной концентрации и замера оптической плотности. Был разработан проточный датчик оптической плотности, способный работать непосредственно с фотобиореактором в проточной культуре. Данный датчик не требует разбавления культуры и может работать без вмешательства извне. Основная задача датчика – измерение оптической плотности культуры на всех стадиях роста и возможность в дальнейшем подключения программного модуля, способного считывать данные с датчика с заданным интервалом времени и вести их цифровую запись.

Ключевые слова. Микроводоросли, спектрофотометрия, светодиод, рассеяние света.

FLOW SENSOR FOR DETERMINING THE OPTICAL DENSITY OF CULTURE MICROALGAE

Havrilov P.E., Azarov A.A., Lelekov A.S.

Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: havrilovpyotr@gmail.com

Annotation. The optical density is one of the main biomass of microalgae culture determination method. Spectrophotometric method is widely used for this. This process requires direct cultivation of culture, dilution to the desired concentration and measurement of the optical density. Flow sensor of optical density which able to work directly with the photobioreactor in running culture was developed. This sensor does not require a tempering of the culture and can operate without interference from outside. The main task of the sensor - measurement of the optical density of the culture at all stages of growth, and opportunity the software module in the future to connect, which be able to read data from the sensor with a predetermined time interval and keep digital recording.

Key words: Microalgae, spectrophotometry, LED, light scattering.

Микроводоросли ранее успешно использовались в качестве сырья для производства фармацевтической продукции, пищевых добавок и химических веществ [1-4]. Некоторые виды микроводорослей являются потенциальными источниками биотоплива благодаря их высокой скорости роста и высокому содержанию масла [5-7]. Производство достаточного количества биомассы с заданным биохимическим составом – основная предпосылка производства микроводорослей для получения конечных продуктов. Оптимизация расходов и поддержания высокой производительности являются ключевыми компонентами, чтобы управлять количеством и стоимостью производства биомассы микроводорослей.

Мониторинг и контроль в режиме реального времени обеспечивает информационную базу данных различных параметров культуры микроводорослей.

Для крупномасштабных систем производства микроводорослей, с точки зрения эффективности управления системой в целом, контроль производства с точки зрения оптимального использования ресурсов, сбора информации о состоянии культуры и его оптимизации (состав среды, массовая информация, освещение, температура, pH, растворенный уровень кислорода и т.д.) имеют решающее значение для того, чтобы добиться максимальной прибыли [8].

Особенно необходимы измерения биологических переменных, в том числе биомассы клеток, размера клеток, морфологического состава клеток, содержание пигментов и липидов, потому что они являются прямыми показателями динамики роста культуры микроводорослей. Стандартные методы, разработанные для измерения этих переменных, являются либо слишком трудоемким или не осуществимы для мониторинга и управления в режиме реального времени [9].

Спектрофотометрия широко используется для оценки этих биологических переменных, путем измерения оптической плотности, мутности или флуоресценции культуры. Метод спектрофотометрии наиболее предпочтителен для мониторинга и контроля систем культивирования микроводорослей в режиме реального времени.

Есть некоторые коммерческие датчики контроля концентрации клеток микроводорослей. Тем не менее, большинство из них предназначены для контроля биомассы микроводорослей в естественных условиях, которая значительно ниже, чем концентрация клеток микроводорослей в плотных лабораторных культурах и производственных масштабах. Кроме того, эти датчики являются слишком дорогими для применения в небольших объемах. Таким образом, их использование в фотобиореакторах для производства водорослей нецелесообразно.

Всего известно несколько исследований по разработке оптических датчиков и систем контроля для микроводорослей. Например, датчик «Сандерс» рассчитан на измерение интенсивности света прошедшего через прозрачную трубку, содержащую клетки микроводоросли. В качестве источника света использовались светодиоды с длиной волны 880 нм, а в качестве приёмника использовался фотодиод расположенный на другом конце трубки. Датчик использовался для оценки концентрации клеток *Nannochloropsis oceanica*.

«Бриасоулис» разработали автоматизированную систему (проточный датчик) для *Nannochloropsis oceanica*. Светодиоды в паре с фотоприемником были использованы для измерения коэффициента пропускания света клеточной культуры при длинах волн 470, 518, 630 и 940 нм. Датчик имеет абсолютную погрешность до 9 %.

Фирма «Недбал» описала систему мониторинга концентрации хлорофилла и плотности цианобактерий встроенными датчиками непосредственно в фотобиореактор. Оптическая плотность вещества измерялась длиной волны света 680 и 735 нм. Количество клеток и концентрация хлорофилла в клетках была пропорциональна оптической плотности. Кроме того датчик был разработан для специальных фотобиореакторов, благодаря чему реконфигурация и recalibration датчика необходима только если он интегрирован в другую среду.

«Марксен» разработали систему биореактора для культивирования *Synechocystis* ПСС6803. Чистая масса микроводорослей определялась путем нахождения оптической плотности раствора при длине волны 870 нм. Концентрация хлорофилла в растворе определялась методом амплитудно-импульсной модуляции (АИМ).

«Яо» разработали и испытали датчик для нахождения оптической плотности с использованием светодиодов двух длин волн (красный и ближний ИК) для контроля роста водорослей. Датчик мог оценить концентрацию

биомассы в интервале 0.05-0.5 оптической плотности в комнатных условиях. Исследования показали зависимость показаний датчика от внешней температуры благодаря проведению опыта в уличных условиях.

На сколько нам известно, не существует такого датчика который если в свободном доступе для измерения нескольких биологических параметров в режиме реального времени как внутри так и снаружи РВР, в диапазоне высокой концентрации клеток без пред подготовки образцов (промывки, разбавления, фильтрации). Таким образом, мы опишем далее проектирование, разработку и оценку развития относительно дешевого, разнородного оптопарного датчика, с возможностью использования снаружи фотобиореактора для мониторинга оптической плотности и роста микроводорослей в режиме реального времени.

Оптическая плотность является экспресс методом определения биомассы и пигментного состава культуры микроводорослей. Как правило, оптическую плотность в биологических исследованиях определяют спектрофотометрическим методом. Однако, данный метод имеет ряд недостатков: необходимость отбора пробы из фотобиореактора при каждом измерении; необходимость разбавления пробы при больших концентрациях клеток микроводорослей; при изменении положения кюветы в спектрофотометрическом приборе наблюдается изменение величины оптической плотности, что связано с рассеянием света в культуре.

На основании вышеизложенных проблем возникает необходимость в разработке простого датчика определения оптической плотности культуры микроводорослей который бы удовлетворял бы следующим требованиям:

1. Датчик подключен к фотобиореактору и обеспечивает с заданной частотой определение оптической плотности
2. Мощность источника света датчика должна быть достаточна для работы в широком диапазоне плотностей
3. Для уменьшения влияния светорассеяния на показания датчика необходимо фиксировать положение источника света и фотоприемника.

Материалы и методы.

Поставлена задача разработать датчик, который подключен непосредственно к фотобиореактору и способен работать в широком диапазоне оптических плотностей. В качестве культуры микроводорослей мы использовали *Spirulina platensis*.

Устройство представляет собой стеклянную кювету длиной 40 мм и внутренним диаметром 20 мм (см. рис. 1). С торцов кювета расположены 2 герметично приклеенных стекла. Так же имеются 2 штуцера внутренним диаметром 3 мм, которые обеспечивают непрерывный приток и отток культуры из кюветы. Кювета изолирована от внешних побочных источников освещения. С одной стороны находится широконаправленный светодиод с длиной волны 730 нм. Светодиод помещен в рефлектор, с помощью которого широконаправленный световой поток становится линейно направленным. Световой поток направлен таким образом, чтобы полностью освещать проточную кювету по всей площади. С обратной стороны кюветы находится фотоэлемент, к которому подключен мультиметр. Мультиметр работает в режиме вольтметра, тем самым регистрируя напряжение на фотоэлементе.

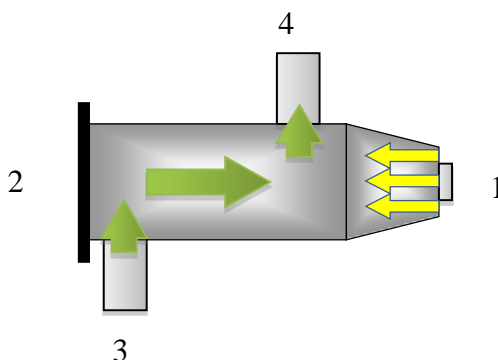


Рисунок 1 – Схема проточного датчика. 1 – светодиод, 2 – фотоприемник, 3 – входной штуцер для культуры, 4 – выходной штуцер для культуры

Эксплуатация датчика. Перед установкой на фотобиореактор в датчик заливается дистиллированная вода для калибровки и определения максимального напряжения на фотоэлементе. В нашем случае это оказалось 530 мВ. Это напряжение будем считать за U_0 . После калибровки датчик подключается к фотобиореактору. Непрерывный поток культуры обеспечивается воздушным барботажом. При циркулировании культуры через проточный датчик снимается напряжение на фотоэлементе с помощью мультиметра, работающий в режиме запоминания максимального напряжения при измерении. Это необходимо ввиду того, что при протекании культуры имеют место колебания оптической плотности, а, следовательно, и напряжения на фотоэлементе. Эксперимент длился в течение 14 сут. Каждые сутки примерно в одно и то же время снимались данные с датчика. По истечению эксперимента в датчик был залит дистиллят для определения U_0 . Повторное измерения значения максимального напряжения на фотоэлементе показало 520 мВ, что свидетельствует о том, что нарастание на датчике культуры микроводорослей было минимальным.

Результаты и обсуждение.

В качестве исходных данных мы использовали 3 параметра: U_0 , мВ – начальное значения напряжения на датчике с дистиллятом, U , мВ – значение напряжения, которое снимается с датчиком непосредственно во время измерения, время, сут – значение промежутка времени, через которое снимались данные напряжения. Был построен график зависимости оптической плотности от времени.

Была определена сухая концентрация микроводорослей в начале и конце эксперимента и составила 0,423 г/л и 3,61 г/л соответственно.

По данным датчика рассчитаны пропускание T и оптическая плотность D

$$T = \frac{U}{U_0},$$

$$D = -\lg T.$$

Как видно из графика, оптическая плотность равномерно растет. Если взять отношение конечной и начальной оптической плотности, оно будет примерно равно отношению конечной и начальной сухой концентрации микроводорослей $8,93 \approx 8,53$. Это свидетельствует о том, что оптическая плотность изменяется пропорционально биомассе с небольшими отклонениями.

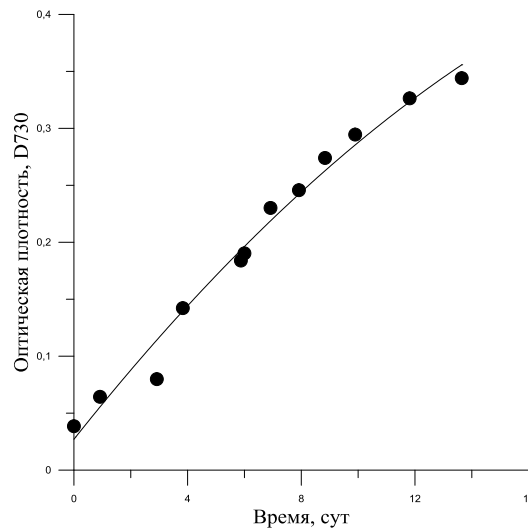


Рисунок 2 – Зависимость оптической плотности культуры *Spirulina platensis* от времени

Таблица 1 – Данные датчика за время эксперимента

Время, сут	U, мВ	T	D
0,00	485	0,92	0,038534
0,92	457	0,86	0,06436
2,92	441	0,83	0,079837
3,83	382	0,72	0,142213
5,88	347	0,65	0,183946
6,00	342	0,65	0,19025
6,92	312	0,59	0,230121
7,92	301	0,57	0,245709
8,83	282	0,53	0,274027
9,90	269	0,51	0,294524
11,81	250	0,47	0,326336
13,65	240	0,45	0,344065

Данные, снятые с проточного датчика свидетельствуют о том, что он может быть использован как экспресс-метод определения оптической плотности и, соответственно, биомассы водорослей. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими спектрофотометрическими методами, такие как: быстрота снятия данных, отсутствие необходимости в разбавлении культуры, непрерывность хода эксперимента. В дальнейшем планируется подключить датчик к программному модулю на платформе Arduino, способного считывать данные с датчика с заданным интервалом времени и вести их цифровую запись с последующей обработкой.

Выводы.

- Разработано устройство, идеально подходящее для практического применения его в научных исследованиях при минимальных затратах.
- Устройство проверено и запущено в эксплуатацию в научных исследованиях лаборатории физики.
- Далее планируется развитие устройства до абсолютно нового уровня светорегистрирующих приборов и запуск его в эксплуатацию в промышленных научно-исследовательских центрах

Список литературы / References:

1. Harun R., Singh M., Forde, G.M., Danquah M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2010, vol. 14, pp. 1037-1047.
2. Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de-Bashan L.E., Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, 2011, vol. 45, pp. 11-36.
3. Wiltshire K., Boersma M., Möller A., Buhtz H. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *scenedesmus obliquus* (chlorophyceae). *Aquat. Ecol.*, 2000, vol. 34, pp. 119-126.
4. Barclay W.R., Meager K.M., Abril J.R. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.*, 1994, vol. 6, pp. 123-129.
5. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 2007, vol. 25, pp. 294-306.
6. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2010, vol. 14, pp. 217-232.
7. Radakovits R., Jinkerson R.E., Darzins A., Posewitz M.C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot. Cell*, 2010, vol. 9, pp. 486-501.
8. Richmond A., Zhang C.W. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *nannochloropsis* sp. outdoors. *J. Biotechnol.*, 2001, vol. 85, pp. 259-269.
9. Lee S., Yoon B., Oh H. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.*, 1998, vol. 12, pp. 553-556.

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ И АНТИБИТИКА НОВАТРОНА НА КЛЕТКИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Сало В.А., Папкина А.С., Рубакина В.А., Лантушенко А.О.
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: lantushenko@mail.ru

Аннотация. Исследовано комбинированное воздействие противоопухолевого антибиотика новатрона и немодифицированного фуллерена на клетки буккального эпителия человека. Состояние хроматина в клетках оценивалось по количеству гранул гетерохроматина (КГГ) в ядрах клеток после окрашивания орсеином. Клеточная суспензия обрабатывалась растворами с постоянной концентрацией новатрона и переменной концентрацией фуллерена. При комбинированном воздействии ДНК-интеркалятора новатрона на непродлиферирующие клетки буккального эпителия выявлено концентрационно-зависимое восстановление функциональной активности клеточного ядра при введении немодифицированного C₆₀ фуллерена.

Ключевые слова: фуллерен C₆₀, клетки буккального эпителия человека, новатрон.

THE COMBINED EFFECT OF THE C₆₀ FULLERENE AND ANTIBIOTIC NOVATRONE ON HUMAN BUCCAL EPITHELIAL CELLS

Salo V.A., Papkova A.S., Rubakina V.A., Lantushenko A.O.
Sevastopol State University
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia
e-mail: lantushenko@mail.ru

Summary. The combined effect of the antitumor antibiotic NOV and pristine fullerene on human buccal epithelial cells was studied. Assessment of the chromatin in the cells was evaluated by the number of heterochromatin granules (KGG) in the nuclei of cells after orsein staining. The cell suspension was treated with a solution of NOV at constant concentration and variable fullerene concentration. Under the combined action of DNA-intercalator novatrone on non-proliferating buccal epithelium cells a concentration-dependent restoration of the functional activity of the cell nucleus was observed on addition of pristine C₆₀ fullerene.

Key words: C₆₀ fullerene, human buccal epithelial cells, novatrone.