

ОЦЕНКА ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS ПО РАССЕЯНИЮ СВЕТА СУСПЕНЗИЕЙ КЛЕТОК

Железнова С.Н.¹, Ключкова В.С.², Геворгиз Р.Г.¹

¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского» РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

Поступила в редакцию: 30.07.2021

Аннотация. Экспериментально показано, что оптическая плотность (D_{750}) суспензии *Porphyrididium purpureum* и абсолютно сухой вес связаны линейной зависимостью. Методом наименьших квадратов рассчитан коэффициент связи оптической плотностью D_{750} и сырой массы культуры, который равен 0,051 ($R^2=0,99$). Учитывая долю воды в сырой массе *P. purpureum* ($0,132\pm 0,01$, $n=5$), можно записать связь оптической плотности и сухой массы *P. purpureum*: $D_{750} = 0,395 \cdot V_{\text{сух}}$, где $V_{\text{сух}}$ – плотность культуры, выраженная в граммах сухой массы на литр. Данное выражение позволяет по оптической плотности *P. purpureum* определить сухую массу клеток в культуре. Отмечено, что оценка биомассы *P. purpureum* по оптической плотности культуры на КФК-3 зависит от положения кюветы в кюветодержателе и может изменять показания прибора в 1,9 раз, так как при использовании КФК-3 происходит измерение суммы величин оптической плотности и рассеяния света (ослабление). Таким образом, разработан экспресс метод оценки плотности биомассы *P. purpureum* по оптической плотности.

Ключевые слова: методы измерения плотности, оптическая плотность, красные икродоросли.

Ключевым параметром во многих исследованиях микроводорослей является плотность культуры. В литературе приводятся разные методы измерения плотности культур микроводорослей: оптический и весовой методы, метод окисляемости биомассы, прямой подсчет клеток и т.п. [1-4]. Оптические методы широко используются в биологии, так как требуют наименьших затрат по времени и ресурсам. Однако, мы сталкиваемся с целым рядом факторов, которые так или иначе приводят к значительным погрешностям. Например, агглютинация клеток, интенсивное рассеяние светового потока и пр. Особые трудности возникают при работе с культурами красных микроводорослей. Это связано с тем, что красные микроводоросли синтезируют большое количество экзополисахаридов (особенно в стационарной фазе роста), которые обволакивают клетку и защищают ее от агрессивных внешних условий среды [5,6]. Экзопалисахариды, попадая в питательную среду, изменяют оптические характеристики суспензии клеток, а также повышают вязкость культуры, что затрудняет оценку плотности культуры как оптическим методом, так и прямым методом взвешивания.

В литературе встречаются попытки выявления взаимосвязи между оптической плотностью культуры и концентрацией клеток красных микроводорослей, но полученные результаты достаточно противоречивы [7]. Отсутствие полноценного исследования оценки плотности культуры разных микроводорослей оптическими методами не позволяет получать надежные данные о динамике биомассы как в накопительной, так и в проточной культуре *P. purpureum*. Проблема экспресс-оценки биомассы *P. purpureum* по оптической плотности культуры особенно остро стоит при культивировании микроводорослей в промышленных масштабах, т.к. ошибки при измерениях плотности в промышленных фотобиореакторах увеличиваются кратно.

Цель работы – разработать экспресс-метод, позволяющий оценить плотность культуры *P. purpureum* посредством измерения оптической плотности культуры с использованием фотоэлектрорадиометра КФК-3.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали культуру *Porphyrididium purpureum*, полученную из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН. Альгологически чистую культуру во всех экспериментах выращивали на питательной среде Тренкеншу [8] методом накопительной культуры. Все лабораторные эксперименты проводили в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочей толщиной слоя суспензии 3 см и объемом 2 л в условиях круглосуточного освещения люминесцентными лампами. Интенсивность света в разных точках на рабочей поверхности фотобиореактора варьировала от 8 до 13 клк и в среднем составляла 10 клк. Равномерное перемешивание суспензии в фотобиореакторе осуществляли посредством барботирования воздуха с помощью компрессора (0,5 л воздуха в минуту на 1 л культуры). Эксперименты проводили при оптимальных значениях pH = 8-9.

Плотность культуры определяли двумя методами: 1) прямым взвешиванием сырой массы в полипропиленовых пробирках в четырех повторностях на аналитических весах с погрешностью 0,1 мг после осаждения клеток центрифугированием (1600 g) в течение 15 мин; 2) турбидиметрическим методом измеряли величину ослабления (оптической плотности) культуры на длине волны 750 нм с использованием фотоэлектрорадиометра КФК-3 (кювета 0,5 см) [9]. Кювету в кюветодержатель устанавливали в максимальной близости к фотоприемнику для снижения величины рассеяния света. Пробы, для которых показания прибора выходили за пределы рабочего диапазона прибора предварительно разбавляли морской водой, подбирая

коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-3 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2-0,6 единицы). При определении плотности культуры методом прямого взвешивания биомассы четыре сухие полипропиленовые пробирки предварительно взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,1 мг. Аликвоты суспензии *P. purpureum* объемом 10 мл отбирали из фотобиореактора в данные пробирки с помощью дозатора. Затем биомассу осаждали центрифугированием (3000 об/мин 15 мин) и удаляли надосадочную жидкость. Оставшуюся в пробирке биомассу *P. purpureum* промывали изотоническим раствором хлорида натрия (6‰) два-три раза для удаления экзополисахаридов. Оставшиеся капли влаги на стенках пробирок удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Пробирки с сырой биомассой взвешивали на аналитических весах. Учитывая объём аликвоты, по разнице весов пробирок с биомассой и без биомассы рассчитывали плотность культуры в фотобиореакторе, выраженную в граммах сырой биомассы на литр культуры.

Для определения доли воды в сырой биомассе после центрифугирования промытый осадок количественно 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. Затем остужали бюксы до температуры воздуха в эксикаторе с силикагелем. Бюксы с сухой биомассой взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г и по разнице весов до и после высушивания рассчитывали долю воды в сырой массе водорослей.

Для получения спектра культуры в диапазоне от 400 до 800 нм с учетом рассеяния света использовали двухлучевой спектрофотометр Lambda 365 Double Beam UV-Visible, который оснащён интегрирующей сферой диаметром 60 мм с покрытием BaSO₄. Спектры регистрировались относительно дистиллированной воды в кюветах в 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Оптически методы для оценки плотности культуры микроводорослей различных систематических групп используются достаточно давно [1,2,9-12]. Обычно для оценки плотности культуры используют связь оптической плотности культуры в области неспецифического поглощения (730–750 нм) и концентрации клеток в суспензии, выраженной в млн.клеток на мл или грамм сухой биомассы на литр. Чтобы получить такую связь проводят ряд параллельных измерений оптической плотности и сухой биомассы в суспензии. При этом зачастую используют приборы, не предназначенные для измерения мутных образцов. Т.е., по сути, при использовании таких приборов происходит измерение не оптической плотности культуры микроводорослей, а суммы величин оптической плотности и рассеяния света (ослабление). Причем рассеяние света зависит от положения кюветы в кюветодержателе. По нашим данным при измерении плотности культуры *P. purpureum* на КФК-3 различное положение кюветы в кюветодержателе может изменять показания прибора в 1,9 раз (рис.1). Аналогичная ситуация наблюдается и для других видов микроводорослей [2].

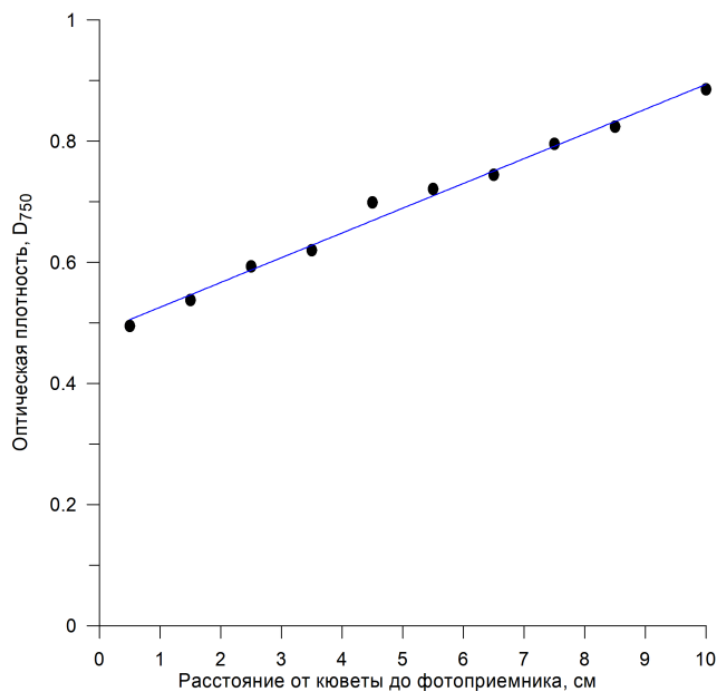


Рисунок 1. Зависимость показаний прибора КФК-3 от положения кюветы в кюветодержателе при измерении оптической плотности *Porphyridium purpureum* (кювета 0,5 см). Линия – аппроксимация экспериментальных данных выражением $D_{750} = 0,041 \cdot l + 0,49$, где l – расстояние от кюветы до фотоприемника

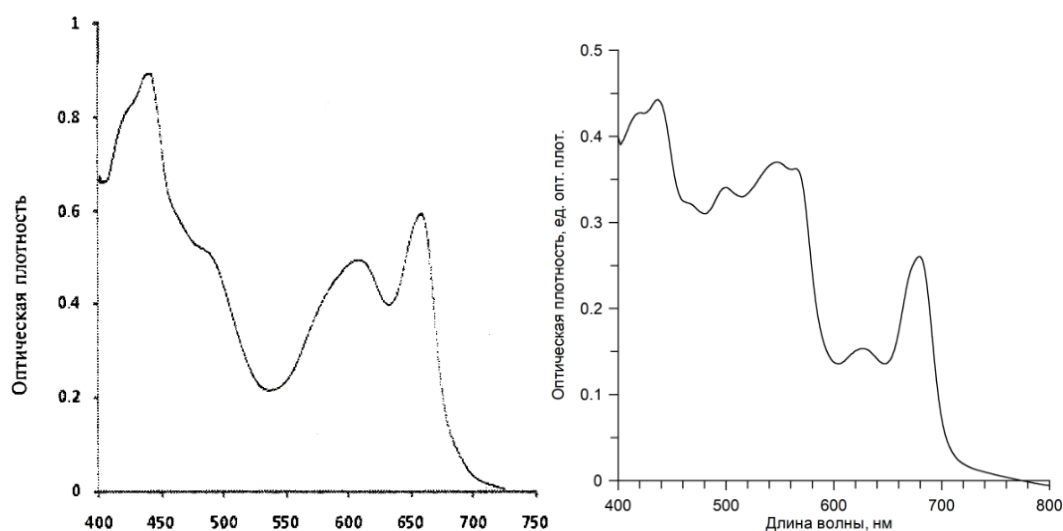


Рисунок 2. Оптический спектр нативной культуры спирулины, полученный в работе [10] на спектрофотометре СФ-14 (ЛЮМО) с интегрирующей сферой (слева). Оптический спектр нативной культуры *Porphyridium purpureum*, полученный в данном исследовании на спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible с интегрирующей сферой (справа)

В клетках микроводорослей содержится достаточно большое количество активно поглощающих свет фотосинтетических пигментов. Концентрация пигментов может варьировать в широких пределах, что влечёт за собой изменение в широких пределах спектральных характеристик культур микроводорослей. Поскольку фотосинтетические пигменты характеризуются высокой поглощающей способностью, для оценки плотности культуры подбирают такой диапазон световых волн, который лежит за пределами спектра поглощения фотосинтетических пигментов. На практике обычно используют 730–800 нм. Следует отметить, что в этом диапазоне свет не поглощается, но рассеивается. Это наглядно демонстрируют измерение спектральных характеристик культур микроводорослей на спектрофотометре с интегрирующей сферой. Например, на рисунке 2 представлен спектр нативной культуры спирулины *Arthrospira (Spirulina) platensis* из работы [10], который получен на спектрофотометре СФ-14 (ЛЮМО) с интегрирующей сферой. На спектре явно видно, что оптическая плотность в диапазоне 730–750 нм равна нулю.

Для нативной культуры *P. purpureum*, наблюдается практически такая же ситуация (рис. 2), но из-за несовершенства прибора Lambda 365 Double Beam UV-Visible часть рассеянного света не учитывается, поэтому в области 730–800 нм значения оптической плотности не равна нулю¹ и даже отрицательные.

На основе вышеприведённых спектров культур микроводорослей, полученных на различных спектрофотометрах с интегрирующей сферой, можно утверждать, что нативные культуры микроводорослей различных систематических групп в области >730 нм свет не поглощают, а при измерениях плотности культуры посредством спектрофотометров, не снабженных интегрирующей сферой, показания приборов указывает лишь на некоторую величину рассеянного света.

Из закона Бугера-Ламберта-Бера следует связь величины ослабления монохроматического пучка света и суммы показателей поглощения и рассеяния света:

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu_\lambda l} = I_0 \cdot e^{-(k_\lambda + d_\lambda)l}, \quad (1)$$

где I_0 – интенсивность плоской монохроматической световой волны, падающей на слой вещества; I – интенсивность плоской монохроматической световой волны на выходе из слоя вещества; μ_λ – показатель ослабления светового потока; k_λ – показатель поглощения света веществом; d_λ – показатель рассеяния света веществом; l – толщина слоя.

Для разбавленных растворов вещества в непоглощающем и нерассеивающем свет растворителе справедливы равенства:

$$k_\lambda = \chi_\lambda \cdot c \text{ и } d_\lambda = \xi_\lambda \cdot c, \quad (2)$$

где χ_λ и ξ_λ – некоторые постоянные величины, зависящие от свойств растворенного вещества и длины световой волны; c – концентрация растворенного вещества.

Объединяя (1) и (2), можно записать:

¹ В СФ-14 измерительная кювета помещается внутрь интегрирующей сферы, поэтому учитывается весь рассеивающийся образцом свет. В отличие от СФ-14 измерительная кювета у Lambda 365 Double Beam UV-Visible помещается за пределами интегрирующей сферы, поэтому учитывается только та часть рассеянного света, которая попадает внутрь интегрирующей сферы.

$$I = I_0 \cdot e^{-(\chi_\lambda + \xi_\lambda) \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-0,4343 \cdot (\chi_\lambda + \xi_\lambda) \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-D_\lambda}, \quad (3)$$

где χ_λ и ξ_λ – показатели поглощения и рассеяния света растворенным веществом единичной концентрации, ε_λ – коэффициент экстинкции, зависящий от свойств растворенного вещества и длины световой волны; D – оптическая плотность.

Если свет не поглощается веществом, а только рассеивается, т.е. показатель поглощения равен нулю, тогда из (1) и (3) следует:

$$I = I_0 \cdot e^{-d_\lambda \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-0,4343 \cdot \xi_\lambda \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l} \quad (4)$$

В таком случае коэффициент экстинкции ε_λ характеризует рассеивающую способность вещества при заданной длине световой волны, а величина ослабления светового потока (T) при постоянстве величин c и l , определяется только рассеиванием света:

$$\lg \frac{I}{I_0} = \lg T = -\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l = -D_\lambda \quad (5)$$

Как было показано выше, в области неспецифического поглощения культуры микроводорослей из-за чрезвычайной гетерогенности суспензия клеток активно рассеивает свет, но не поглощает, поэтому при измерении оптических характеристик культур микроводорослей на приборах, не снабженных интегрирующей сферой по сути своей, дают оценку величине рассеянного клетками света. Следовательно, для оценки плотности культур микроводорослей вполне возможно использование выражения (5) без введения каких-либо поправок.

Для установления зависимости между оптической плотностью культуры и сухой биомассой *P. purpureum* провели ряд параллельных измерений сырой массы *P. purpureum* методом взвешивания после центрифугирования аликвоты в полипропиленовых пробирках и оптической плотности культуры на длине волны 750 нм. Полученная зависимость представлена на рисунке 3.

Заметим, на рисунке 3 представлены средние значения по четырем параллельным измерениям. Несмотря на то, что во всех параллельных измерениях коэффициент вариации был достаточно мал (не более 13%), на графиках наблюдается значительный разброс данных. Следовательно, у многих измерений наблюдалась систематическая погрешность. На наш взгляд, эта систематическая погрешность измерений возникла из-за полисахаридов, которые *P. purpureum* синтезирует в достаточно больших количествах [5,6]. При взвешивании сырой массы *P. purpureum* именно полисахариды были источником ошибок, т.к. полностью удалить их из биомассы после центрифугирования не представлялось возможным. При многократном промывании биомассы изотоническим раствором хлорида натрия часть полисахаридов оставалось в биомассе, что приводило к систематическим ошибкам измерения.

По нашим экспериментальным данным методом наименьших квадратов рассчитан коэффициент ($R^2=0,99$) связи оптической плотностью D_{750} и сырой массы водорослей в культуре (рис. 3)

$$D_{750} = 0,051 \cdot V_{сыр}, \quad (6)$$

где $V_{сыр}$ – плотность культуры, выраженная в граммах сырой массы на литр.

Учитывая долю воды в сырой массе *P. purpureum* ($0,132 \pm 0,01$, $n=5$), можно записать связь оптической плотности и сухой массы водорослей:

$$D_{750} = 0,395 \cdot V_{сух}, \quad (7)$$

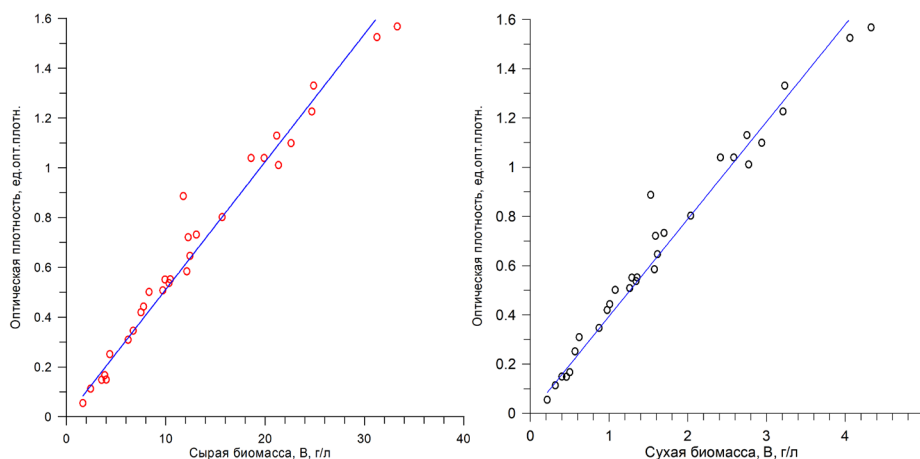


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности на длине волны 750 нм от биомассы в культуре *Porphyridium purpureum*, выраженной в единицах сырой массы (слева) и сухой массы (справа). Точки на графиках – средние значения из четырех параллельных измерений. Линия – аппроксимация по уравнению (5): $D_{750} = 0,051 \cdot V_{сыр}$ (слева, $R^2=0,99$) и $D_{750} = 0,395 \cdot V_{сух}$ (справа, $R^2=0,99$)

где $B_{сух}$ – плотность культуры, выраженная в граммах сухой массы на литр.

Выражение (7) позволяет по оптической плотности *P. purpureum* определить сухую массу клеток в культуре:

$$B_{сух} = 1/0,395 \cdot D_{750} = 2,53 \cdot D_{750}, \quad (8)$$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработан экспресс метод оценки плотности биомассы *P. purpureum* по оптической плотности. Используя выражение (8) по оптической плотности на длине волны 750 нм можно оценить плотность культуры *P. purpureum*. Отметим, поскольку все измерения оптической плотности в данном исследовании проведены на КФК-3 (кювета 0,5 см) при установке кюветы в максимальной близости к фотоприемнику (рис. 1), при использовании других кювет или местоположения кюветы в кюветодержателе для выражения (8) потребуются поправки. Например, если кювета установлена на расстоянии 6 см от фотоприемника, тогда для условия измерений, представленных на рисунке 1, коэффициент 0,395 в выражении (7) необходимо уменьшить в $0,51/0,736=0,69$ раза, т.е. использовать коэффициент равный $0,395/0,69 = 0,57$. Соответственно в выражении (8) вместо 2,53 необходимо использовать коэффициент $1 / 0,57 = 1,75$.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0

Список литературы / References:

1. Абдуллаев А.А., Семенов В.Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Teod и некоторые ее физиологические характеристики. *Физиология растений*, 1974, т. 21, вып. 6, с. 1145-1152. [Abdullaev A.A., Seminenko V.E. Intensive culture of *Dunaliella salina* Teod and some of its physiological characteristics. *Fiziologiya rasteniy*, 1974, vol. 21, iss. 6, pp. 1145-1152. (In Russ.)]
2. 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., Alisieovich A.V., Shmatok M.G. Estimate of the biomass of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. by optical density of culture. *Ekologiya moray*, 2005, vol. 70, pp. 96-106. (In Russ.)]
3. 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. Evaluation of the culture density of phototrophic microorganisms by the method of iodate oxidizability. Sevastopol, 2015, 31 p. (In Russ.)]
4. 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, iss. 1, pp. 1-13. DOI: 10.1186/s12934-018-0957-0
5. Balti R., Le Balc'h R., Brodu N., Gilbert M., Le Gouic B., Le Gall S., Siquin C., Masse A. Concentration and purification of *Porphyridium cruentum* exopolysaccharides by membrane filtration at various cross-flow velocities. *Process Biochemistry*, 2018, vol. 74, pp. 175-184. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.06.021
6. Li T., Xu J., Wu H., Jiang P., Chen Z., Xiang W. Growth and biochemical composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under different nitrogen concentrations. *Marine Drugs*, 2019, vol. 17, iss. 2, pp. 1-16.
7. Rodas-Zuluaga L.I., Castillo-Zacarias C., NunezGoitia G., Martinez-Prado M.A., Rodriguez-Rodriguez J., LopezPacheco I.Y., Sosa-Hernandez J.E., Iqbal H.M.N., Parra-Saldivar R. Implementation of kLa-Based strategy for Scaling Up *Porphyridium purpureum* (red marine microalga) to produce high-value phycoerythrin, fatty acids, and proteins. *Marine Drugs*, 2021, vol. 19, iss. 6, pp. 1-15. DOI: 10.3390/md19060290
8. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. Biological Science Series*, 1981, vol. 5, iss. 1, pp. 75-82. (In Russ.)]
9. Lu L., Yang G., Zhu B., Pan K. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2017, vol. 46, iss. 1, pp. 2265-2272.
10. Мельников С.С., Самович Т.В., Мананкина Е.Е., Будакова Е.А. Влияние чередования световых и темновых периодов на продуктивность *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler. *Альгология*, 2012, т. 22, № 2, с. 121-130. <http://dspace.nbu.gov.ua/handle/123456789/64212> [Melnikov S.S., Samovich T.V., Manankina E.E., Budakova E.A. Influence of light and dark periods alternation on production of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler. *Algologiya*, 2012, vol. 22, iss. 2, pp. 121-130. (In Russ.)]
11. Сидько Ф.Я., Ерошин Н.С. Определение концентрации пигментов и числа клеток во взвеси водорослей на фотоэлектроколориметре ФЭКН-57. *Управляемое культивирование микроводорослей*. М.: Наука, 1964, с. 38-42. [Sidko F.Ya., Eroshin N.S. Determination of the concentration of pigments and the number of cells in a suspension of algae using a FEKN-57 photoelectric colorimeter. *Guided microalgae cultivation*. Moscow: Nauka, 1964, pp. 38-42. (In Russ.)]
12. Сидько Ф.Я., Ерошин Н.С., Белянин В.Н. Датчик оптической плотности, изготовленный на базе фотоэлектроколориметра ФЭКМ. *Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов*. Москва: Наука, 1967, с. 31-33. [Sidko F.Ya., Eroshin N.S., Belyanin V.N. Optical density sensor based on the FEKM photoelectric colorimeter. *Continuous controlled cultivation of microorganisms*. Moscow: Nauka, 1967, pp. 31-33. (In Russ.)]

DETERMINATION OF CULTURE *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS DENSITY BY LIGHT SCATTERING BY CELL SUSPENSION**Zheleznova S.N.¹, Klochkova V.S.², Gevorgiz R.G.¹**¹ Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS
Sevastopol, Russia; e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru² Sevastopol State University

33 Universitetskaya str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru

Abstract. It is shown that the optical density (D_{750}) of a suspension of *Porphyridium purpureum* and absolutely dry weight are linearly related. Using the method of least squares, the coefficient of connection between the optical density D_{750} and the wet weight of the culture was calculated, which is 0.051. Knowing the proportion of water in the wet mass of *P. purpureum* (0.132), it is possible to determine the relationship between the optical density and dry weight of *P. purpureum*, where the coefficient of relationship between the optical density of culture and dry weight is 0.395. It is noted that the determination of *P. purpureum* biomass by optical density of the culture on KFK-3 depends on the position of the cuvette in the cuvette holder and can change the instrument values by 1.9 times. Since when using KFK-3, the sum of the values of optical density and light scattering (attenuation) is measured. Thus, an express method for assessing the density of *P. purpureum* biomass by optical density has been developed.

Key words: methods for measuring density, optical density, red microalgae.