

Ρ. Π. Τρενκενσού, Ρ. Γ. Γκεβοργκίτζ,
Ε. Γ. Λιανάκης, Χ. Α. Οικονόμου

ΕΠΙΤΟΜΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΙΣ
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ



Σεβαστούπολη, 2009

БИБЛИОТЕКА БИОТЕХНОЛОГА

Р. П. Тренкеншу, Р. Г. Геворгиз
Е. Г. Лианакис, Х. А. Иконому

**КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО ПО
КУЛЬТИВИРОВАНИЮ
СПИРУЛИНЫ**

Перевод с русского
Кузвесовой М. В.

Севастополь, 2009

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΤΟΥ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ

Ρ. Π. Τρενκενσού, Ρ. Γ. Γκεβοργκίτζ,
Ε. Γ. Λιανάκης, Χ. Α. Οικονόμου

ΕΠΙΤΟΜΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΙΣ
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ

Μετάφραση από την ρώσικη γλώσσα
Μ. Β. Κουσβέσοβα

Σεβαστούπολη, 2009

ΠΔΚ 582.232

Ρ. Π. Τρενκενσού, Ρ. Γ. Γκεβοργκίτζ, Ε. Γ. Λιανάκης, Χ. Α. Οικονόμου. Επίτομη μελέτη στις αρχές της καλλιέργειας της σπιρουλίνας. — Ωκεανολογικό κέντρο ΕΑΕ Ουκρανίας, 2009. — 101 σ. — (Προέκδοση)

Αυτή η έκδοση είναι σύντομη περιγραφή για την καλλιέργεια της σπιρουλίνας σε εργαστηριακές συνθήκες και στις συνθήκες παραγωγής βιομάζας σπιρουλίνας στην βιομηχανική κλίμακα. Το δοκίμιο αυτό έχει ενδιαφέρον για τους βιοτεχνολόγους και τους εξ—ειδικευμένους στον τομέα της βιομηχανικής καλλιέργειας αλγών.

Επίσης θα φανεί χρήσιμο στους μεταπτυχιακούς φοιτητές ανάλογης εξειδίκευσης και γενικά στους φοιτητές των ανωτέρων και ανωτάτων σχολών.

Настоящее издание представляет собой краткое руководство по культивированию спирулины в лабораторных условиях и в условиях производства биомассы спирулины в промышленных масштабах.

Руководство представляет интерес для биотехнологов и специалистов в области промышленного культивирования микродорослей, а также для аспирантов соответствующих специальностей и студентов высших учебных заведений.

Εισηγητής: Ph. D Μποροβκόφ Α. Μ.

Рецензент: κ. б. н. Боровков А. Б.

Εγκρίθηκε για την έκδοση από το ακαδημαϊκό συμβούλιο του Ινστι—τούτου Βιολογίας Νοτίων Θαλασσών του Α. Ο. Κοβαλέβσκι Αρ. Πρω—τοκόλλου Νο 2. 17.02.09.

Утверждено к печати Учёным советом Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского. Протокол № 2 от 17.02.09.

© Οι Συγγραφείς — Ρ. Π. Τρενκενσού, Ρ. Γ. Γκεβοργκίτζ, Ε. Γ. Λιανάκης, Χ. Α. Οικονόμου, 2009.

© Μετάφραση απο την ρωσική γλώσσα — Μ. Β. Κουσβέσοβα, 2009.

© Σχεδιασμός και στοιχειοθεσία — Ρ. Γ. Γκεβοργκίτζ, 2009.

Εισαγωγή

Αυτό το εγχειρίδιο — είναι το αρχικό στάδιο εργασίας πάνω στο ελληνοουκρανικό εγχείρημα βιομηχανικής καλλιέργειας βιομάζας σπιρουλίνας υψηλής ποιότητας. Η σπιρουλίνα — είναι μικροσκοπικό φύκος, το οποίο έχει αυξανόμενο ενδιαφέρον σαν αντικείμενο βιοτεχνολογίας. Η βιομάζα της διαθέτει εξαιρετικές ιδιότητες, εξ αιτίας της σύνθεσης μερικών βιοχημικών συστατικών, τα οποία δεν βρίσκονται σε κανένα άλλο οργανισμό στη Γη. Αυξάνεται η χρήση του μικροάλγους στην σύγχρονη δραστηριότητα του ανθρώπου: στην ιατρική, κτηνοτροφία, μελισσοκομία, αγροτική παραγωγή, καθαρισμό αποβλήτων, παραγωγή καλλυντικών κλπ. Έχει ανεβεί η ζήτηση στη βιομάζας σπιρουλίνας και τα προϊόντα της επεξεργασίας της. Για αυτό το λόγο εμφανίστηκε η ανάγκη μελέτης τεχνολογιών υψηλών αποδόσεων σε ελεγχόμενες συνθήκες. Για κάποια είδη φυκών τέτοιες τεχνολογίες ήδη υπάρχουν. Π.χ., το κυανοπράσινο μικροφύκος *Spirulina (Arthrospira) platensis* καλλιεργείται στις τεχνητές δεξαμενές σε όλο το κόσμο πάνω από μισό αιώνα.

Η επιτυχία στην καλλιέργεια των μικροαλγών εξαρτάται σε υψηλό βαθμό από το επίπεδο γνώσεων σχετικά με το αντικείμενο της καλλιέργειας, της βιολογίας του, και των χαρακτηριστικών της ανάπτυξης του. Η συνέχεια στην εργασία με τα βιολογικά αντικείμενα είναι η επιλογή της τεχνολογίας που βασίζεται στην πρακτική πείρα και διαίσθηση. Όμως τέτοια αντιμετώπιση του προβλήματος δεν επιτρέπει την απόκτηση (παραγωγή) ικανοποιητικής ποιότητας βιομάζας.

Η σύντομη καθοδήγηση αυτή έχει στόχο να βοηθήσει όλους αυτούς που θέλουν να αυξήσουν το θεωρητικό τους επίπεδο στον τομέα της καλλιέργειας μικροφυκών. Στα απλά παραδείγματα που περιέχει δείχνει τον τρόπο εκτίμησης της παραγωγικότητας, τον τρόπο υπολογισμού θρεπτικού μέσου πως επιλέγεται η κατάλληλη πυκνότητα της καλλιέργειας κλπ.

1. Ταυτότητα του στελέχους μικροφύκους *Spirulina platensis*

Паспорт штамма *Spirulina platensis*

Επιστημονική ονομασία.

Arthrospira platensis (Nordstedt) Gomont, 1892

Άλλες ονομασίες.

Spirulina platensis (Nordstedt) Geitler, 1925; *Spirulina jenneri* var. *platensis* Nordstedt, 1884

Ταξινόμηση.

Cyanobacteria; Cyanophyceae; Oscillatoriophycidae;
Oscillatoriales; Phormidiaceae; Phormidioideae.

Ίδρυμα όπου φυλάσσεται

Ινστιτούτο βιολογίας νότιων θαλασσών, ΕΑΕ, (ΙνΒΝΘ της πόλης Σεβαστούπολη): Τμήμα βιοτεχνολογίας και φυτικών πόρων, τμήμα οικολογικής φυσιολογίας μικροφυκών

Προέλευση του στελέχους.

Αναγεννημένο από ταμπλέτες (προϊόν Ινδίας) το 1996

Ποίος και που ταυτοποίησε το συγκεκριμένο στέλεχος.

Αλισιγιεβιτς Α.Β. 1996 από το τμήμα βιοτεχνολογίας και φυτικών πόρων ΙνΒΝΘ

Νεότερη περιγραφή του στελέχους

Αλισιγιεβιτς Α.Β., 2006, τμήμα βιοτεχνολογιών και φυτικών πόρων, ΙνΒΝΘ

Χαρακτηριστικά.

Κυανοπράσινο προκαριωτικό μικροφύκος (κυανοβακτήριο), με ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, σε ύδατα πλούσια σε διοξείδιο του άνθρακα και άλλα οξείδια αυτού, σε περιβάλλον με τροπικές και υποτροπικές συνθήκες θερμοκρασίας. Συγκαταλέγεται στα είδη του πλαγκτόν με χαρακτηριστικά φυτικά (φυτοπλαγκτόν).

Διαθέτει την υψηλότερη ανθεκτικότητα σε διακυμάνσεις του pH, σε διακυμάνσεις της περιεκτικότητας του ύδατος σε άλατα, και θερμοκρασίας, είναι θερμοφιλό.

Μορφολογία.

Τα κύτταρα παρουσιάζουν μικρή διαφοροποίηση (δεν διαθέτει πραγματικό πυρήνα, δεν περιέχει χρωματοσώματα, πυρήνιο, κενοτόπια, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο κλπ). Τα τριχίδια της σπιρουλίνας παρουσιάζονται ραβδοειδή με καμπύλες άκρες, περιβαλλόμενα από μανδύα βλεννώδους υλικού και παρουσιάζει δυνατότητα προώθησης με διαδοχικές κινήσεις με την μορφή ολίσθησης, και με περιστροφικές κινήσεις. Η μορφολογία των κυττάρων ομοιάζει με χαμηλοκύλινδρο και βρίσκονται σε στενή επαφή. Τα διαφράγματα μεταξύ των κυττάρων είναι ορατά

Μορφολογία.

Ο μέσος όρος των χαρακτηριστικών των κυττάρων μετά από μέτρηση 50 κυττάρων από 50 διαφορετικά τριχοειδή είναι: Πλάτος: $6,69 \pm 0,16$ μ, ύψος: $3,87 \pm 0,14$ μ, Μέσο μήκος τριχιδίων: $422,80 \pm 48,91$ μ. Όγκος του κυττάρου: $136,81 \pm 8,04$ μ³, Εμβαδόν της επιφάνειας του κυττάρου: $152,08 \pm 5,97$ μ², δείκτης καμπυλότητας: $0,84 \pm 0,006$

Περιβάλλον καλλιέργειας.

Διάλυμα Zarrouk

Τομείς Εφαρμογής.

Βιοτεχνολογία, ως πηγή βιοενεργών ουσιών, στην κοσμετολογία, ιατρική, και παραγωγή τροφίμων.

Σημείωση.

Με την εντατική καλλιέργεια οι σπειροειδείς μορφές απουσιάζουν. Μέτα από τον μετεμβολιασμό του στελέχους σε νέο θρεπτικό υλικό παρουσιάζεται στατιστικά αξιόλογη (P=95%) μείωση του μέσου μήκους των τριχιδίων και αύξηση του δείκτη καμπυλότητας των κυττάρων. Ταξινόμηση και η συνωνυμία χρησιμοποιούνται σε αντιστοιχία με το Παγκόσμιο κατάλογο

θαλασσίων ειδών (WoRMS) <http://www.marinespecies.org/>

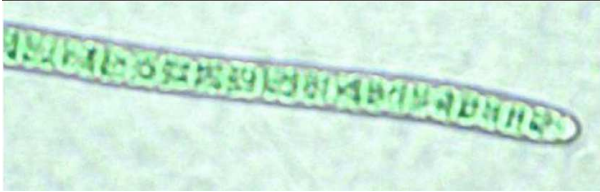
Βιβλιογραφία.

[2, 6, 11, 12]

Σχήμα που αντιστοιχεί στο κύτταρο.

Κύλινδρος με βάση τον κύκλο

Φωτογραφική απεικόνιση.



2. Σύνθεση του διαλύματος Zarrouk

Приготовление питательной среды Заррук

Τομέας χρησιμότητας

Το θρεπτικό διάλυμα Zarrouk χρησιμοποιείται κατά την πρακτική εργαστηριακή και ημβιομηχανική παραγωγή των προκαρυωτικών κυανοπράσινων μικροαλγών του τύπου της *Spirulina platensis* Geitl. [13].

Ορολογία

Αλατούχο θρεπτικό διάλυμα για μικροάλγες — διάλυμα μεταλλικών αλάτων σε νερό το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των αλγών.

Εξοπλισμός

1. Γυάλινο σκεύος με όγκο 1 λίτρων για την παρασκευή του διαλύματος·
2. Γυάλινο σκεύος με όγκο ενός λίτρου για τα ιχνοστοιχεία·
3. Πιπέτα 10 ml ωφέλιμου όγκου με ακρίβεια $\pm 0,1$ ml·
4. Ζυγαριά ακριβείας με περιθώριο λάθους όχι πάνω από $\pm 0,001$ gr.

Αντιδραστήρια

Πίνακας 1: Λίστα αλάτων θρεπτικού διαλύματος.

| № | Ονομασία | γρ/λίτρο | Χημική καθαρότητα |
|----|-----------------------|------------|-------------------|
| 1 | $NaHCO_3$ | 16,8 | χκ |
| 2 | K_2HPO_4 | 0,5 | χκ |
| 3 | $NaNO_3$ | 2,5 | χκ |
| 4 | K_2SO_4 | 1,0 | χκ |
| 5 | $NaCl$ | 1,0 | χκ |
| 6 | $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,2 | χκ |
| 7 | $CaCl_2$ | 0,042 | χκ |
| 8 | $FeSO_4 \times 7H_2O$ | 0,01 | χκ |
| 9 | Na_2EDTA | 0,08 | χκ |
| 10 | Διάλυμα ιχνοστοιχείων | 1 ml/λίτρο | |

Πίνακας 2: Πίνακας σύστασης διαλύματος ιχνοστοιχείων.

| | Ονομασία | γρ/λίτρο | Χημική καθαρότητα |
|---|-----------------------|----------|-------------------|
| 1 | H_3BO_3 | 2,86 | χκ |
| 2 | $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 | χκ |
| 3 | $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,222 | χκ |
| 4 | $CuSO_4 \times 5H_2O$ | 0,08 | χκ |
| 5 | MoO_3 | 0,015 | χκ |
| 6 | NH_4VO | 0,023 | χκ |
| 7 | $CoCl_2$ | 0,044 | χκ |
| 8 | $K_2Cr_2SO_4$ | 0,096 | χκ |

Παρατηρήσεις. Για τα εργαστηριακά πειράματα το διάλυμα παρασκευάζεται με την χρήση αποσταγμένου νερού. Σε συνθήκες βιομηχανικής παραγωγής μπορεί να γίνει χρήση πόσιμου νερού.

Εκτέλεση της διαδικασίας

Οι ποσότητες αλάτων οι οποίες περιγράφονται στον πίνακα 1 τοποθετούνται στο αποσταγμένο νερό με την σειρά που αναγράφονται στο πίνακα.

1. Σε 9 λίτρα νερού διαλύονται 16,8 γραμμάρια του $NaHCO_3$. Θεωρείται ότι το $NaHCO_3$ έχει διαλυθεί εντελώς όταν το διάλυμα του είναι εντελώς διαφανές.
2. Μετά, διαλύονται τα άλατα από το №2 μέχρι και το №9 με την ίδια σειρά που αναγράφονται στον πίνακα 1 και προστίθεται το διάλυμα ιχνοστοιχείων.
3. Συμπληρώνεται ο όγκος με το αποσταγμένο νερό μέχρι 1 λίτρο. Σε 30–60 λεπτά το θρεπτικό μέσο είναι έτοιμο για την χρήση.

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων παρασκευάζεται ξεχωριστά ενωρίτερα, διαλύοντας σε ένα λίτρο νερού τις ποσότητες αλάτων οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα 2.

Έλεγχος ποιότητας

Η ποιότητα του διαλύματος έχει άμεση σχέση με την διαφάνεια του, την εμφάνιση ιζήματος ή όχι και την ύπαρξη χλωρίδας άλλων μικροοργανισμών μετά από μικροσκοπικό έλεγχο.

Υπολογισμός του θρεπτικού μέσου για την σπιρουλίνα. (Расчѐт питательной среды)

Η Μέτρηση των ανόργανων στοιχείων του θρεπτικού μέσου για την σπιρουλίνα εκτελείται ανάλογα με την κυτταρική περιεκτικότητα των χημικών ουσιών. Στον πίνακα 3 παραθέτονται οι μέσες συγκεντρώσεις των ανόργανων χημικών στοιχείων ανά γραμμάριο βιομάζας.

Πίνακας 3: Σύνθεση βιομάζας σπιρουλίνας σε σχέση με την περιεκτικότητα του κυττάρου σε ανόργανα στοιχεία της *Spirulina patensis*.

| Ανόργανο στοιχείο | Περιεκτικότητα βιομάζας, σε μγ/γρ |
|-------------------|-----------------------------------|
| Άνθρακας (C) | 500 |
| Άζωτο (N) | 106,8 |
| Φωσφόρος (P) | 11,4 |
| Κάλιο (K) | 18,8 |
| Νάτριο (Na) | 17,4 |
| Σίδηρος (Fe) | 0,945 |
| Ασβέστιο (Ca) | 0,11 |
| Μαγνήσιο (Mg) | 3,5 |
| Ιχνοστοιχεία | |
| Βόριο (B) | |
| Μαγγάνιο (Mn) | 0,064 |
| Ψευδάργυρος (Zn) | 0,028 |
| Χαλκός (Cu) | 0,015 |
| Μόλυβδος (Mo) | |
| Κοβάλτιο (Co) | 0,0015 |
| Χρώμιο (Cr) | 0,005 |

Οι παραπάνω περιεκτικότητες των ανόργανων ουσιών στην βιομάζα είναι οι ανάγκες (οικονομικοί συντελεστές) της σπιρουλίνας για αυτές τις ουσίες. Δηλαδή για πάρουμε ένα γραμμάριο ξηρής βιομάζας πρέπει να προσθέσουμε τις αναγραφόμενες ποσότητες στον παραπάνω πίνακα 3.

Ας κάνουμε μια μέτρηση συγκέντρωσης αλάτων σύμφωνα με τα απαραίτητα στοιχεία για την παρασκευή του διαλύματος Zarrouk για να παράγουμε 1 γρ ξηρής βιομάζας.

1. Ο Άνθρακας (C) — προστίθεται στο θρεπτικό μέσο με την μορφή $NaHCO_3$ (μαγειρική σόδα). Ας μετρήσουμε το μοριακό βάρος αυτού του άλατος: $MB(NaHCO_3) = 23+1+12+16 \times 3 = 84$. Το Μοριακό Βάρος του άνθρακα $MB(C) = 12$. Το μερικό μοριακό βάρος (μαζικό μερίδιο) $w(C) = 12/84 = 1/7$. Άρα για να παράγουμε ένα γραμμάριο ξηρής βιομάζας στο θρεπτικό μέσο είναι απαραίτητο να προσθέσουμε $0,5 \times 7 = 3,5$ γρ γραμμάρια διττανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$). Στην σύνθεση του διαλύματος Zarrouk προστίθενται 16,8 γρ/λ $NaHCO_3$, αυτό σημαίνει ότι σε ένα λίτρο θρεπτικού μέσου (σε σχέση με τον άνθρακα) μπορούμε να παράγουμε $16,8/3,5 = 4,8$ γρ ξηρής βιομάζας σπιρουλίνας
2. Ο φώσφορος (P) — προστίθεται στο θρεπτικό μέσον με την μορφή $K_2HPO_4 \times 3H_2O$. Ας μετρήσουμε το μοριακό βάρος του άλατος: $MB(K_2HPO_4 \times 3H_2O) = 39 \times 2 + 1 + 32 + 4 \times 16 + 3 \times 18 = 229$. Το μερικό μοριακό βάρος του στοιχειακού φωσφόρου (μαζικό μερίδιο) στο παραπάνω άλας είναι $MB(P) = 32$. Άρα το μαζικό μερίδιο του φωσφόρου είναι $w(P) = 32/229 = 1/7,16$. Προκειμένου να παράγουμε ένα γραμμάριο ξηρής βιομάζας πρέπει να προσθέσουμε στο θρεπτικό μέσο $11,4 \times 7,16 = 81,58$ mgr $K_2HPO_4 \times 3H_2O$. Στην σύνθεση του διαλύματος Zarrouk περιέχονται 0,66 γρ/λ $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, άρα στο ένα λίτρο θρεπτικού μέσου σε σχέση με τον φωσφόρο θα παράγουμε

$0,66 \text{ γρ} / 81,58 \text{ mgr} = 8,1 \text{ γρ}$ ξηρής βιομάζας σπιρουλίνας.

3. Το άζωτο (N) προστίθεται στο διάλυμα με την μορφή — NaNO_3 . Ας μετρήσουμε το μοριακό βάρος αυτού του άλατος: $\text{MB}(\text{NaNO}_3)=23+14+16 \times 3=85$. Το μοριακό βάρος του αζώτου είναι $\text{MB}(\text{N})=14$. Το μερικό μοριακό βάρος του αζώτου στο άλας είναι $w(\text{N})=14/85=1/6,07$. Άρα για την παραγωγή 1 γραμμαρίου ξηρής βιομάζας προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο $106,8 \times 6,07 = 648,43 \text{ mgr}$ νιτρικού νατρίου (NaNO_3). Στην σύνθεση του διαλύματος Ζαρρούκ περιέχονται 2,5 γρ/λ NaNO_3 , δηλαδή για το ένα λίτρο θρεπτικού μέσου (σε σχέση με το άζωτο) μπορούμε να πάρουμε $2,5/0,64843 = 3,855 \text{ γρ}$ ξηρής βιομάζας σπιρουλίνας.

4. Ο σίδηρος (Fe) προστίθεται στο διάλυμα με την μορφή $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Ας μετρήσουμε το μοριακό βάρος του άλατος: $\text{MB}(\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O})=278$. Το μοριακό βάρος του σιδήρου είναι $\text{MB}(\text{Fe})=56$. Το μερικό μοριακό βάρος του σιδήρου στο άλας $w(\text{Fe})=56/278=1/4,96$. Άρα για την παραγωγή 1 γραμμαρίου ξηρής βιομάζας προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο $0,945 \times 4,96=4,68 \text{ mgr}$ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Στην σύνθεση του διαλύματος Ζαρρούκ περιέχονται 10 mgr/λ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, δηλαδή για το ένα λίτρο θρεπτικού μέσου (σε σχέση με τον σίδηρο) μπορούμε να πάρουμε $10/4,68=2,13 \text{ γρ}$ ξηρής βιομάζας σπιρουλίνας.

Παρατήρηση. Πρέπει να σημειώσουμε ότι το άλας $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ διαλύεται σε ξεχωριστό δοχείο μαζί με το άλας Na_2EDTA , που επιτρέπει να σχηματιστεί σύμπλοκη ουσία η οποία μπορεί να καταναλωθεί από τα κύτταρα της άλγης. Η ποσότητα του προστιθέμενου Na_2EDTA (σύμφωνα με τα αναφερόμενα στον πίνακα σύνθεσης του διαλύματος Ζαρρούκ) πρέπει να είναι 8 φορές μεγαλύτερη από την ποσότητα του προστιθέμενου σιδήρου.

5. Το (Ca) προστίθεται στο διάλυμα με την μορφή $CaCl_2 \times 2H_2O$. Ας μετρήσουμε το μοριακό βάρος του άλατος $MB(CaCl_2 \times 2H_2O)=146$. Το μοριακό βάρος του ασβεστίου είναι $MB(Ca)=40$. Το μερικό μοριακό βάρος του ασβεστίου στο άλας $w(Ca)=40/146=1/3,65$. Άρα για την παραγωγή 1 γραμμαρίου ξηρής βιομάζας προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο $11 \times 3,65=40,15$ μγρ $CaCl_2 \times 2H_2O$. Στην σύνθεση του διαλύματος Ζαρρούκ περιέχονται 1 mgr/λ $CaCl_2 \times 2H_2O$, δηλαδή για το ένα λίτρο θρεπτικού μέσου (σε σχέση με το ασβέστιο) μπορούμε να πάρουμε 1 γρ ξηρής βιομάζας σπιρουλίνας.
6. Το μαγνήσιο (Mg) προστίθεται στο διάλυμα με την μορφή $MgSO_4 \times 7H_2O$. Ας μετρήσουμε το μοριακό βάρος του άλατος: $MB(MgSO_4 \times 7H_2O)=246$. Το μοριακό βάρος του μαγνησίου είναι $MB(Mg)=24$. Το μερικό μοριακό βάρος του μαγνησίου στο άλας $w(Mg)=1/10,25$. Άρα για την παραγωγή 1 γραμμαρίου ξηρής βιομάζας προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο $3,5 \times 10,25=35,875$ mgr $MgSO_4 \times 7H_2O$. Στην σύνθεση του διαλύματος Ζαρρούκ περιέχονται 200 mgr/λ $MgSO_4 \times 7H_2O$, δηλαδή για το ένα λίτρο θρεπτικού μέσου (σε σχέση με το μαγνήσιο) μπορούμε να πάρουμε 5,57 γρ ξηρής βιομάζας σπιρουλίνας.
7. Ως αναφορά το K και το Na οι ανάγκες των αλγών στα στοιχεία αυτά, ικανοποιούνται πλήρως με την προσθήκη των αλάτων $NaHCO_3$, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ του πίνακα του Ζαρρούκ (σειρές 1,2). Η προσθήκη των παραπάνω αλάτων (βλέπε πίνακα Ζαρρούκ) γίνεται με στόχο την αύξηση του ωσμωτικού φορτίου (αλατότητα) του διαλύματος μέχρι τα 24 γραμμάρια ανά λίτρο. Η προσθήκη του χλωριούχου νατρίου έχει σαν στόχο την αύξηση οσμωτικότητας του θρεπτικού μέσου, και η προσθήκη του θειικού καλίου ως πηγή θείου.

Παρατήρηση 1H. Η μέτρηση της συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων

γίνεται ακριβώς όπως τα βήματα 1–6.

Παρατήρηση 2Η. Οπουδήποτε άλας που δρα σαν πηγή δομικών στοιχείων των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο μπορούμε να το αντικαταστήσουμε με κάποια άλλη πηγή του ίδιου δομικού στοιχείου. Για παράδειγμα 2,5 γρ $NaNO_3$ σαν πηγή αζώτου, μπορούμε να το αντικαταστήσουμε με 2,1 γρ/λ KNO_3 .

3. Μέθοδος συσσωρευτικών καλλιεργειών (περιοδική καλλιέργεια)

Метод накопительных культур

Ο τομέας που χρησιμοποιείται η μέθοδος περιοδικής καλλιέργειας

Παραδοσιακά οι περισσότεροι ειδικοί στις άλγες χρησιμοποιούν την μέθοδο συσσωρευτικής καλλιέργειας.

Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιείται στην υδροβιολογία, όταν διεξάγεται έρευνα για τις επιδράσεις διαφόρων παραγόντων, στην ανάπτυξη, στην βιοσυνθετική ικανότητα κλπ, ενός υδρόβιου οργανισμού. Καταλαμβάνει ξεχωριστή θέση στην συλλογή και καλλιέργεια μικροφυκών, πχ για την δημιουργία και την συντήρηση αμιγώς καθαρών καλλιεργειών μικροαλγών.

Ονοματολογία

Η μέθοδος συσσωρευτικής καλλιέργειας είναι ο τρόπος καλλιέργειας μικροαλγών κατά την οποία στο φωτισμένο καλλιεργητή που περιέχει θρεπτικό μέσο προσθέτουμε μια μικρή ποσότητα κυττάρων μικροαλγών (εμβόλιο). Με την πάροδο του χρόνου η συγκέντρωση των μικροαλγών φτάνει σε κάποιο μέγιστο αριθμό, δηλαδή, έρχεται κάποια στιγμή όπου η περαιτέρω αύξηση της πυκνότητας δεν είναι πλέον δυνατή, διότι έχουν περιοριστεί πια οι ποσότητες των ανόργανων θρεπτικών ουσιών, η ένταση του φωτός που περνά διαμέσου της καλλιέργειας, ή έχει συμβεί συσσώρευση των προϊόντων του μεταβολισμού, ή κάποιο άλλο φυσικοχημικοί παράγοντες του περιβάλλοντος. Κατόπιν η καλλιέργεια που έχει σχηματιστεί με τον παραπάνω τρόπο χρησιμοποιείται ως εμβόλιο για νέες καλλιέργειες.

Θεωρητική Εισαγωγή

Τυπική εικόνα δυναμικής πυκνότητας περιοδικής καλλιέργειας μικροαλγών φαίνεται στην εικόνα 1 στην σελίδα 21. Η συσσωρευτική καμπύλη ανάπτυξης χωρίζεται σε μερικές φάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένους δείκτες κινητικών παραμέτρων. Αριθμίζοντας κάθε περίοδο ανάπτυξης, θα παραθέσουμε μια συνοπτική περιγραφή τους [10].

1. Φάση προσαρμογής. Σαν κανόνας για την αρχική περίοδο της ανάπτυξης της καλλιέργειας είναι χαρακτηριστική η υπολειπόμενη αύξηση, η ταχύτητα της ανάπτυξης είναι αρνητική, και κατά συνέπεια μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων ή η βιομάζα B . Κατά το χρονικό διάστημα αυτό τα κύτταρα προσαρμόζονται σε καινούργιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η διάρκεια της παραπάνω περιόδου μπορεί να είναι μερικά λεπτά έως μερικά εικοσιτετράωρα, εξαρτάται από την εντονότητα των διαφορών των νέων συνθηκών σε σχέση με τις προηγούμενες που ήταν προσαρμοσμένα τα κύτταρα. Η δυναμική πυκνότητα της καλλιέργειας στην φάση αυτή περιγράφεται με τον παρακάτω τύπο:

$$B = B_0 \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-t_0)}, \quad (1)$$

όπου το μ_r — είναι η ειδική ταχύτητα καύσεων, (οι μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων για την συντήρησή τους): όπου t_0 : B_0 — είναι ο χρόνος εισαγωγής της βιομάζας και η αρχική ποσότητα βιομάζας.

2. Εκθετική (λογαριθμική) φάση. Δείκτης της σχετικής ταχύτητας ανάπτυξης μ σε αυτή την φάση ορίζεται συνήθως με βάση τις συνθήκες φωτεινότητας, οι οποίες παραμένουν ίδιες για τις χαμηλές πυκνότητες, επειδή τα κύτταρα δεν σκιάζουν το ένα το άλλο. Αυτή η περίοδος χαρακτηρίζεται από σταθερότητα της ειδικής ταχύτητας ανάπτυξης $\mu = \mu_m = const.$ Για την εκθετική φάση ανάπτυξης χρησιμοποιείται ο συσχετισμός

της πυκνότητας της καλλιέργειας με τον χρόνο με την εξής μορφή:

$$B = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t - t_{ln})}, \quad (2)$$

όπου μ_m παριστά τη μέγιστη ειδική ταχύτητα αύξησης· όπου B_{ln} η πυκνότητα της καλλιέργειας την χρονική στιγμή t_{ln} .

3. Φάση της γραμμικής ανάπτυξης. Σχεδόν πάντα στην καμπύλη της ανάπτυξης των μικροαλγών μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι σχηματίζεται ένα πλατώ. Αυτό χαρακτηρίζει την σταθερότητα της απόλυτης ταχύτητας αύξησης (αποτελεσματικότητα της καλλιέργειας, $P = P_m = const$). Στην χρονική στιγμή που παρατηρείται το πλατώ η ταχύτητα ανάπτυξης εξαρτάται από τον ρυθμό χορήγησης του διοξειδίου του άνθρακα, το οποίο απορροφάται πλήρως από την καλλιέργεια και περιορίζει την παραγωγικότητα της καλλιέργειας. Για την φάση γραμμικής αύξησης η σχέση χρόνου βιομάζας παριστάνεται με τον εξής τύπο:

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l), \quad (3)$$

όπου B_l -είναι η πυκνότητα καλλιέργειας κατά την χρονική στιγμή της αρχής της γραμμικής φάσης t_l .

4. Φάση της επιβραδυνόμενης ανάπτυξης. Η φάση επιβραδυνόμενης ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η απόλυτη ταχύτητα ανάπτυξης σε αυτό το σημείο της συσσωρευτικής καμπύλης μειώνεται. Η επιβράδυνση αυτή μπορεί να εξηγηθεί με τους παρακάτω δύο λόγους: Στην πρώτη περίπτωση συμβαίνει αλλαγή κάποιου απαραίτητου παράγοντα, δηλαδή, η συγκέντρωση κάποιου από τα στοιχεία απαραίτητων αλάτων έχει μειωθεί κάτω από το όριο που επιτρέπει την σύνθεση των δομικών στοιχείων του κυττάρου, σύμφωνα με τον νόμο των Michaelis-Menten. Στο τέλος της φάσης η ταχύτητα ανάπτυξης μειώνεται σταδιακά μέχρι μηδενισμού. Στην δεύτερη περίπτωση η πυκνότητα της καλλιέργειας φτάνει σε σημείο, όπου η ταχύτητα σύνθεσης, η οποία καθορίζεται από εξωτερική ροή θρεπτικών

συστατικών, συνδέεται αναλογικά με την ταχύτητα μεταβολισμού της καλλιέργειας, δηλαδή, στο τέλος της φάσης επιβράδυνσης η καλλιέργεια φτάνει σε σημείο, όπου το κάθε κύτταρο παράγει το ίδιο ποσό ενέργειας (φωτοσυνθέτει) με αυτό που καταναλώνει (αναπνέει). Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από την σταθερότητα της ειδικής ταχύτητας αναπνοής $\mu_r = const$. Για την φάση επιβράδυνσης η σχέση βιομάζας με τον χρόνο εκφράζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$B = B_m + (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-t^l)}, \quad (4)$$

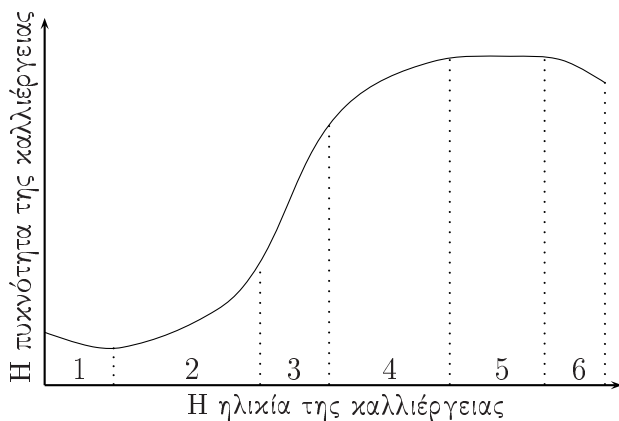
όπου η B_m είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας σε στάση· B^l είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας στο τέλος της γραμμικής φάσης του t^l .

5. Φάση μηδενικής ανάπτυξης. Χαρακτηρίζεται από την παύση της ανάπτυξης των μικροαλγών ($\mu = 0$, $P = 0$). Η καλλιέργεια έχει φτάσει στην μέγιστη πυκνότητα B_m , η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες φωτισμού, από την αρχική συγκέντρωση κυττάρων του εμβολίου, από την συγκέντρωση του αερίου διοξειδίου του άνθρακα και πολλούς άλλους φυσικοχημικούς παράγοντες. Η σταθερότητα της πυκνότητας της βιομάζας μπορεί να είναι διαφορετική από την σταθερότητα της κυτταρικής συγκέντρωσης. Η διάρκεια της φάσης της μηδενικής ανάπτυξης μπορεί να εκτείνεται σε μερικά εικοσιτετράωρα. Για την παράσταση της δυναμικής βιομάζας χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$B = B_m, \quad (5)$$

όπου B_m είναι η συγκέντρωση της βιομάζας σε φάση μηδενικής ανάπτυξης.

6. Φάση της φθίνουσας ανάπτυξης. Κατά την φάση της φθίνουσας ανάπτυξης παρατηρείται η υπερίσχυση καταβολισμού στα κύτταρα παρά αναβολισμού. Η ταχύτητα ανάπτυξης



Σχήμα 1. Δυναμική συσσώρευση βιομάζας ή συγκέντρωση κυττάρων στην περιοδική καλλιέργεια μικροαλγών. Με τις διακεκομμένες γραμμές σημειώνονται τα σχετικά όρια των φάσεων της ανάπτυξης της καλλιέργειας: 1 — φάση προσαρμογής, 2 — φάση εκθετικής ανάπτυξης, 3 — φάση γραμμικής ανάπτυξης, 4 — φάση επιβραδυνόμενης ανάπτυξης, 5 — φάση μηδενικής ανάπτυξης, 6 — φάση φθίνουσας ανάπτυξης.

(αρνητική) ισούται με την ταχύτητα λύσης των κυττάρων. Στην φάση της φθίνουσας ανάπτυξης παρατηρούνται βαθιές φυσιολογικές αλλαγές των κυττάρων των μικροαλγών μέχρι της απώλειας της καλλιέργειας. Παρατηρείται λύση των κυττάρων της βιομάζας, που συνήθως οδηγεί σε ανάπτυξη βακτηριδίων. Εμφανίζεται κάποια νέα αλγοβακτηριολογική χλωρίδα, δηλαδή η καλλιέργεια των μικροαλγών σταματάει να υφίσταται. Σε περίπτωση που η καλλιέργεια στην φάση φθίνουσας ανάπτυξης χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο για την νέα περιοδική καλλιέργεια, τότε ένα μέρος των κυττάρων δεν έχει την δυνατότητα να ανανήψει στο κανονικό ρυθμό μεταβολισμού. Ο τύπος δυναμικής πυκνότητας καλλιέργειας στην φάση φθίνουσας ανάπτυξης είναι ο ίδιος με τον τύπο (1) για την φάση προσαρμογής:

$$B = B_m \cdot e^{-\mu_r \cdot (t - t^{st})}, \quad (6)$$

όπου μ_r είναι η ειδική ταχύτητα μεταβολισμού, όπου B_m είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας σε φάση σταθερής ανάπτυξης, όπου t^{st} είναι ο χρόνος τέλους σταθερής ανάπτυξης.

Παράδειγμα υπολογισμού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και παραγωγικότητας πάνω στα πειραματικά αποτελέσματα

Пример расчёта величин удельной скорости роста и продуктивности

Ορισμός στόχου

Έλεγχος δυναμικής ανάπτυξης *Spirulina platensis* στην συσσωρευτική καλλιέργεια. Με βάση πειραματικών αποτελεσμάτων θα μετρήσουμε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και παραγωγικότητας.

Ορισμός του στόχου

Λεπτομερής περιγραφή του αντικείμενου είναι στην σ. 6.

Ονοματολογία

Βιομάζα — εκφράζεται σε μονάδες μάζας ποσότητας ζωντανού υλικού στη μονάδα εμβαδού ή όγκου περιβάλλοντος που ζει αυτό το υλικό (g/m^2 η g/l).

Τα όργανα

1. Ζυγαριά ηλεκτρονική «Sartorius», τύπου 2, με εύρος λαθών $\pm 0,001$ γρ.
2. Ιοντόμετρο εργαστηριακό I-160M με “ιοντοεκλεκτικό” ηλεκτρόδιο ELIS 121 NO_3 . Απόλυτο εύρος λαθών — 0,001 γρ/λ.
3. Κομπρεσέρ ενυδρείου Maxima παραγωγικότητα 4,8 λεπτό.
4. Θερμόμετρο υδραργύρου 0-50°C με εύρος λαθών $\pm 0,5$.
5. Λουξόμετρο U-116 με εύρους λαθών όχι πάνω από 5% του ποσού που μετράμε.
6. Πιπέτες «Biohit», 1000–5000 μl , $\pm 1\%$, 10–100 μl , $\pm 1,5$ –2,5%, 200–1000 μl , ± 1 –1,5%.

Τα σκευη

1. Μεζούρες 10 ml .
2. Κύλινδρος 1000 ml .
3. Γυάλινα ποτήρια 0,5 λ.

Θρεπτικό μέσο

Τρόπος παρασκευής και η σύνθεση του θρεπτικού μέσου — στον πίνακα 1 στη σ. 10.

Οι μονάδες που μετράμε

1. Οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας *S. platensis* στο μήκος κύματος 750 nm, (D_{750}):
2. pH:
3. Θερμοκρασίες, $t^{\circ}\text{C}$.

Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος

Για την καλλιέργεια της *S. platensis* χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργητές επίπεδο-παράλληλου τύπου από γυαλί με όγκο 2 λ με συνθήκες 24ωρου φωτισμού. Σαν πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε σύστημα λαμπών LB-40 με μέση φωτεινότητα 10 klx. Το εναιώρημα αναδευόταν με αέρα με χρήση του κομπρεσέρ για τα ενυδρεία «Maxima». Η διάταξη του συστήματος καλλιέργειας της *S. platensis* — στην εικόνα 2.

Η σειρά εκτέλεσης του πειράματος

Στον καλλιεργητή τοποθετήθηκαν το εμβόλιο και το θρεπτικό μέσο σε ποσότητες ώστε η αρχική πυκνότητα της καλλιέργειας να γίνει $D_{750} = 0,056$. Στην διάρκεια όλου το πειράματος η λήψη δειγμάτων γινόταν κάθε μέρα στις 11.00 η ώρα. Σταμάτοισ την παροχή αερίου και μετριοταν την θερμοκρασία και το pH στον καλλιεργητή. Πριν την λήψη δείγματος ο όγκος του εναιωρήματος συμπληρωνόταν μέχρι το σημείο 2 λ με αποσταγμένο νερό με στόχο την επανόρθωση του όγκου νερού που είχε εξατμιστεί. Μέτα από καλή ανάδευση του εναιωρήματος των



Σχήμα 2. Η Διάταξη του συστήματος καλλιέργειας της *S. platensis*

φυκών με αναδευτήρα χειρός γινόταν λήψη δειγμάτων με όγκο 2 ml για την μέτρηση οπτικής πυκνότητας της *S. platensis*. Οι πυκνές καλλιέργειες αραιωνόταν με θρεπτικό μέσο πριν την μέτρηση. Για την λήψη δειγμάτων χρησιμοποιόταν πιπέτα (δοσομετρητής) «Biohit» 1–5 ml. Μετά τις μετρήσεις τα δείγματα δεν επιστρεφόταν στους καλλιεργητές.

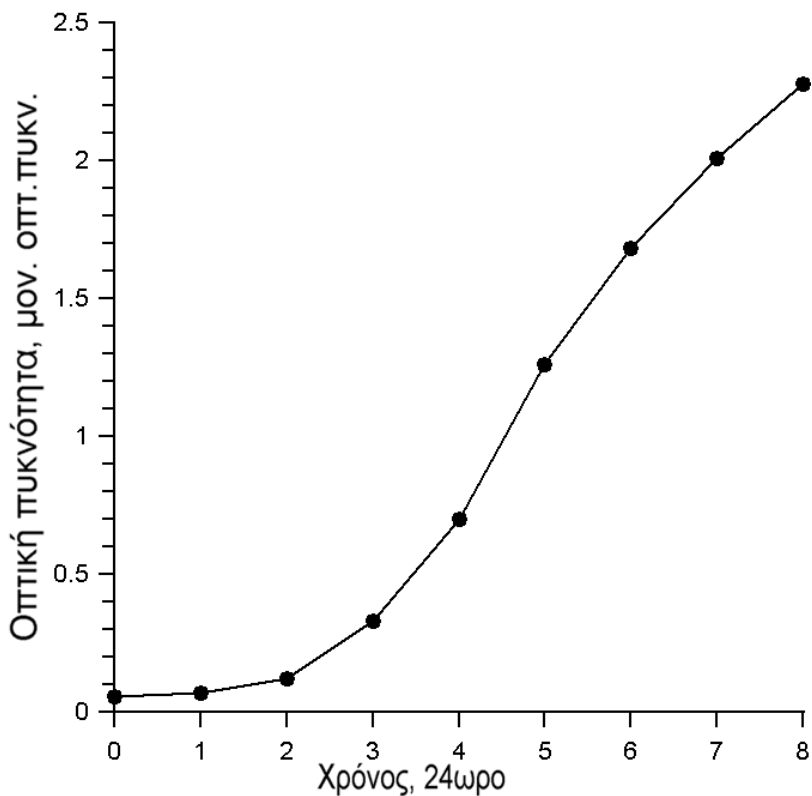
Σειρά των μετρήσεων

Για το κάθε δείκτη κάθε μέρα γινόταν 1 μέτρηση. Παρακάτω είναι η σειρά ενεργειών στην διάρκεια των μετρήσεων:

1. Μέτρηση της φωτεινότητας. Επειδή η απόσταση του καλλιεργητής από την πηγή φωτός ήταν ίδια στην διάρκεια όλου του πειράματος, η φωτεινότητα μετρήθηκε μια φορά στην αρχή του πειράματος·
2. Μέτρηση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας·
3. Μέτρηση του pH της καλλιέργειας·
4. Λήψη των δειγμάτων από τον καλλιεργητή·
5. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της *S. platensis* στο μήκος φωτός 750 nm. Μάρτυρας — αποσταγμένο νερό, η οπτική πυκνότητα του δεν ξεχώριζε από το μέσο της καλλιέργειας. Οι πυκνές καλλιέργειες αραιωνόταν με θρεπτικό μέσο πριν την μέτρηση.

Τα στοιχεία του πειράματος σχετικά με την δυναμική (ρυθμό) ανάπτυξης της *S. platensis* είναι στον πίνακα 3 και στην εικόνα 3.

Όλες τις μετρήσεις των παραμέτρων συσσωρευτικών καμπύλων έγινάν στις μονάδες οπτικής πυκνότητας, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η οπτική πυκνότητα καλλιέργειας D_{750} και η συγκέντρωση των κυττάρων B είναι συνδεδεμένα με γραμμική «έξιωση» $D_{750} = k \cdot B$ [3].



Σχήμα 3. Η δυναμική (ρυθμός) της ανάπτυξης της βιομάζας της *S. platensis*

Ας κάνουμε τις μετρήσεις για την συσσωρευτική καμπύλη που την βλέπουμε στην εικόνα 3.

Οι φάσεις της ανάπτυξης. Το σχήμα της συσσωρευτικής καμπύλης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του καλλιεργητή, τα κινητικά χαρακτηριστικά και τις εξωτερικές συνθήκες, με τα οποία γινόταν καλλιέργεια των φυκών (φωτεινότητα, μεταλλικά στοιχεία κτλπ). Πρώτο βήμα στον ορισμό παραμέτρων οποιασδήποτε συσσωρευτικής καμπύλης είναι το ορισμός των ορίων διαφόρων σταδίων ανάπτυξης. Δυστυχώς, σε αυτό το ερώτημα δεν υπάρχουν κοινώς αναγνωριζόμενοι μέθοδοι και για αυτό το λόγο όλη η ευθύνη αυτής της διαδικασίας πέφτει πάνω στον ερευνητή. Είναι κατανοητό ότι εάν ο χωρισμός της συσσωρευτικής καμπύλης σε φάσεις ανάπτυξης είναι λάθος, τότε και όλοι οι υπόλοιποι υπολογισμοί θα είναι λάθος.

Ας υποθέσουμε ότι η συσσωρευτική καμπύλη στην εικόνα 3 αποτελείται από 2 στάδια ανάπτυξης: εκθετική φάση (από 0 έως 3 24ωρο) και η γραμμική φάση ανάπτυξης (από 3 έως 8 24ωρο).

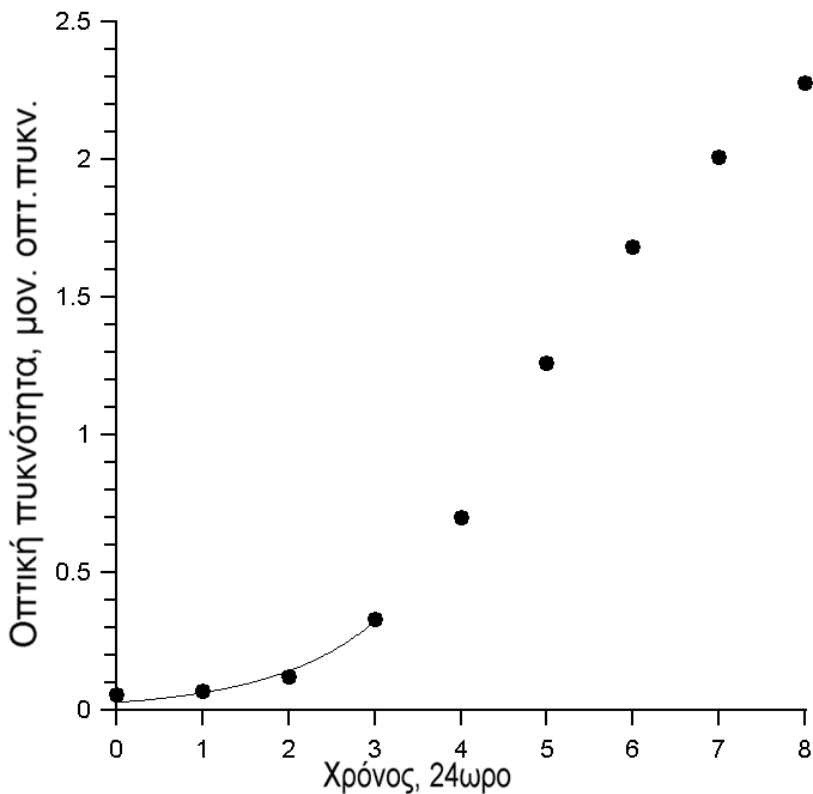
Θα σχηματίσουμε με βάση τα πειραματικά σημεία αυτού του τμήματος της συσσωρευτικής καμπύλης μια συνάρτηση (βλέπε τύπο (2))

$$D(t) = D_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \quad (7)$$

επιλέγοντας συντελεστές D_{ln} και μ_m με τέτοιο τρόπο ώστε το σύνολο τετραγώνων αποστάσεων από τα πειραματικά σημεία μέχρι την καμπύλη θα είναι τα ελάχιστα¹. Ο υπολογισμός των συντελεστών D_{ln} και μ_m για τα δεδομένα από την εικόνα 4 έχει τα εξής αποτελέσματα:

$$D(t) = D_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t-t_{ln})} = 0,03 \cdot e^{0,8 \cdot (t-0)} \quad (8)$$

¹αυτοί οι υπολογισμοί συνήθως γίνονται με χρήση μαθηματικών προγραμμάτων τα οποία πραγματοποιούν στατιστικούς υπολογισμούς ελαχίστων τετραγώνων.



Σχήμα 4. Ο υπολογισμός του μεγίστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης *S. platensis* με το τύπο (8).

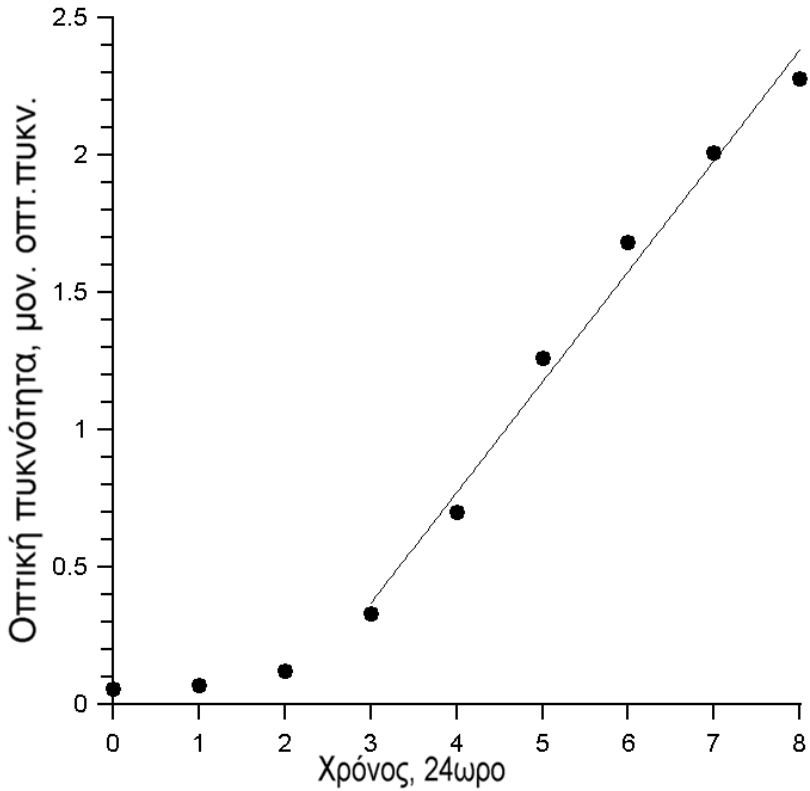
Υπολογισμός της παραγωγικότητας. Για τον υπολογισμό της μέγιστης παραγωγικότητας (P_m) χρησιμοποιούμε τα δεδομένα της γραμμικής φάσης ανάπτυξης.

Μέτρηση του συντελεστή τύπου για το γραμμικό “τμήμα” (βλέπε εικόνα 5):

$$D(t) = D_l + P_m \cdot (t - 3) = 0.84 + 0.4 \cdot (8 - 3) \quad (9)$$

Εφαπτομένη γωνίας γραμμικής εξίσωσης στις συντεταγμένες $D - D_l$ και $t - t_l$ ισούται με το P_m , δηλαδή $P_m = 0,4 \text{ g} \cdot (l \cdot 24\omega\rho)^{-1}$

Δηλαδή με τα πειραματικά δεδομένα έχουμε μέτρηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης $\mu_m = 0,8 \text{ 24}\omega\rho^{-1}$ και της μέγιστης παραγωγικότητας $P_m = 0,4 \text{ g} \cdot (l \cdot 24\omega\rho)^{-1}$



Σχήμα 5. Ο υπολογισμός του μεγίστου ρυθμού παραγωγικότητας *S. platensis* με το τύπο (9)

4. Αναλογική μέθοδος συνεχούς καλλιέργειας (σχεδόν συνεχής καλλιέργεια)

Квазинепрерывная культура

Ο τομέας που χρησιμοποιείται

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης συνεχών καλλιεργειών ο πειραματιστής δεν μπορεί να αποφύγει την επέμβαση του στην ανάπτυξη των μικροαλγών, διότι για τον έλεγχο των διάφορων δεικτών των μικροαλγών -όπως πυκνότητα καλλιέργειας, βιοχημική σύνθεση βιομάζας, κλπ. είναι απαραίτητη η λήψη δειγμάτων, δηλαδή η αφαίρεση κάποιου ποσού βιομάζας. Πολλές φορές η επιστροφή του ληφθέντος δείγματος στον καλλιεργητή είναι αδύνατη. Τότε αναζητούμε κάποιο συμβιβασμό μεταξύ του χρονικού διαστήματος που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις δύο διαδοχικές λήψεις δειγμάτων, των όγκων των δειγμάτων, και του όγκου καλλιέργειας. Η μέθοδος συσσωρευτικών καλλιεργειών είναι μία από τις περιπτώσεις διαφορετικού τύπου μεθόδου συνεχόμενων καλλιεργειών. Η μέθοδος συνεχόμενης καλλιέργειας είναι αποτελεσματικότερη όταν πρόκειται για την ελεγχόμενη καλλιέργεια μικροαλγών, ενώ αυτή η μέθοδος παρουσιάζει πλεονέκτημα σε σχέση με τις συγκρίσεις των πειραματικών αποτελεσμάτων όπως: η μελέτη των αλλαγών της βιοχημικής σύνθεσης των μικροαλγών κατά την αλλαγή διαφόρων παραγόντων, η εξερεύνηση των ρυθμών σύνθεσης/διάλυσης κάποιων ουσιών που παίρνουν μέρος στον κύκλο του μεταβολισμού των μικροαλγών, τον ορισμό της παραγωγικότητας του συστήματος της καλλιέργειας, κλπ. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό στην μέθοδο αυτή καλλιέργειας είναι ότι η καλλιέργεια αναπτύσσεται στο στάδιο της σταθερής δυναμικής φάσης, όπου σταθεροποιείται η ισότητα όλων των

ειδικών ρυθμών και διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό την θεωρητική μελέτη των συντελεστών ανάπτυξης και βιοχημικών δεικτών του συγκεκριμένου είδους αλγών.

Ονοματολογία

Η μέθοδος καλλιέργειας μικροαλγών ονομάζεται συνεχόμενη (σχεδόν συνεχόμενη) αν πληρούνται οι παρακάτω όροι: 1) Ο όγκος της καλλιέργειας των αναπτυσσόμενων μικροαλγών φωτίζεται, αναδύεται και παραμένει σταθερός· 2) Όταν στη βιομάζα προστίθεται το θρεπτικό μέσο με συγκεκριμένο ρυθμό· 3) Από τον όγκο της καλλιέργειας αφαιρείται μέρος βιομάζας που ισούται με τον ρυθμό που προστίθεται το θρεπτικό υλικό.

Θεωρητική Εισαγωγή

Είναι δύσκολο να καταφέρουμε την δημιουργία της πλήρους συνεχόμενης ροής θρεπτικού μέσου με την χρήση των παραπάνω τριών παραγόντων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος σχεδόν συνεχούς καλλιέργειας. Η ουσία της μεθόδου είναι ότι η αντικατάσταση μέρους της καλλιέργειας με το ίδιο ποσό θρεπτικού μέσου εκτελείται όχι συνεχόμενα, αλλά διακεκομμένα. Υπάρχουν δύο παράγοντες που ορίζουν τον τρόπο λειτουργίας της καλλιέργειας: ο όγκος της αφαιρούμενης βιομάζας / προστιθέμενου μέσου και η χρονική διάρκεια μεταξύ των διαδικασιών ανανέωσης της βιομάζας. Τροποποιώντας αυτούς τους δύο παράγοντες μπορούμε να ελέγχουμε τον ρυθμό ροής και να συντηρούμε την πυκνότητα της καλλιέργειας στο επιθυμητό επίπεδο.

Σημαντικό ρόλο στην δυναμική πυκνότητας σχεδόν συνεχούς καλλιέργειας, παίζει ο δείκτης σχετικής αραιώσης καλλιέργειας και είναι ο συντελεστής της αραιώσης

$$\theta = \frac{\overline{B}_k}{B_k}, \quad (10)$$

όπου \overline{B}_k είναι η πυκνότητα καλλιέργειας πριν την αραιώση, όπου B_k είναι η πυκνότητα καλλιέργειας μετά την αραιώση και k είναι ο αύξων αριθμός της αραιώσης.

Ο συντελεστής της αραιώσης δείχνει επί πόσες φορές έχει αραιωθεί η καλλιέργεια και κυμαίνεται από το ένα (με μηδενική αραιώση) μέχρι το άπειρο (η καλλιέργεια μετά την αραιώση έχει μηδενική πυκνότητα). Προσαρμόζοντας τον συντελεστή πυκνότητας μπορούμε να ρυθμίσουμε την πυκνότητα της καλλιέργειας μέχρι συγκεκριμένο όριο. Για την αραιώση της καλλιέργειας μέχρι την επιθυμητή πυκνότητα από τον συνολικό (W) όγκο αιώρησης μικροαλγών στο καλλιεργητή, θα αφαιρέσουμε μέρος της καλλιέργειας με όγκο w και θα προσθέσουμε ίδιο όγκο θρεπτικού μέσου, δηλαδή ο συντελεστής αραιώσης μπορεί να εκφραστεί με τον τύπο:

$$\theta = \frac{W}{W - w}. \quad (11)$$

Ας περιγράψουμε τον τύπο για τον όγκο αφαίρεσης (ή προσθήκης):

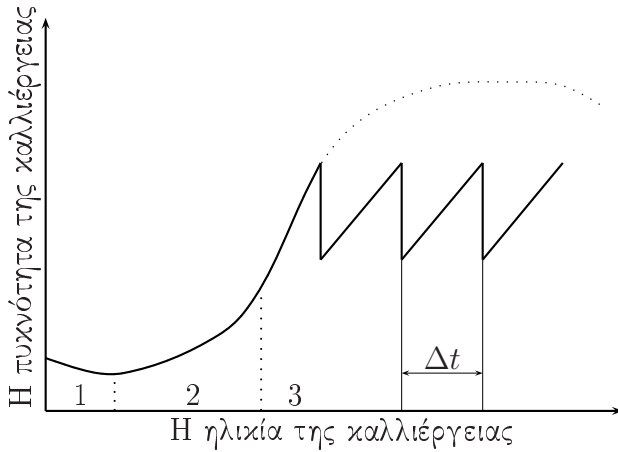
$$w = W - \frac{W}{\theta} = W \cdot \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) = W \cdot \left(\frac{\theta - 1}{\theta}\right). \quad (12)$$

Ο τύπος για τον ειδικό ρυθμό ροής θρεπτικού μέσου σε σχέση με τον όγκο καλλιεργητή είναι ο εξής:

$$\omega = \frac{w}{W \cdot \Delta t} = \frac{\theta - 1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}. \quad (13)$$

όπου Δt είναι η περίοδος του χρόνου μεταξύ των αραιώσεων.

Είναι ολοφάνερο το γεγονός ότι με την μείωση του διαστήματος μεταξύ των αραιώσεων και του όγκου προσθαφαίρεσης με κατάλληλο τρόπο ώστε οι ρυθμοί να παραμένουν σταθεροί (χωρίς αλλαγές) η σχεδόν συνεχής καλλιέργεια πλησιάζει στα επίπεδα της απολύτων συνεχούς. Η τυπική εικόνα δυναμικής αύξησης της σχεδόν συνεχούς καλλιέργειας περιγράφεται στην εικόνα 6.



Σχήμα 6. Η δυναμική πυκνότητα της σχεδόν συνεχούς καλλιέργειας μικροαλγών Η διακεκομμένη γραμμή σημειώνει την συσσωρευτική καμπύλη ανάπτυξης. Με την συνεχή γραμμή σημειώνεται η δυναμική πυκνότητα της καλλιέργειας κατά την προσθαφαίρεση υλικού.

5. Η μέθοδος μέτρησης οπτικής πυκνότητας εναιώρηματος κατώτερων φωτοτρόπων μικροαλγών

Методика измерения оптической плотности

Ο τομέας χρησιμότητας.

Η μέθοδος περιγράφει την διαδικασία μέτρησης μείωση της φωτεινής ροής μέσω του εναιωρήματος γηγενούς καλλιέργειας κατώτερων φωτοτρόπων (π.χ. μικροαλγών) στο μήκος κύματος φωτός 750 nm σε μονάδες οπτικής πυκνότητας. Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μελέτη των οπτικών χαρακτηριστικών των φυτών [1], στην δική μας περίπτωση εναιωρήματος των μικροαλγών [7].

Ονοματολογία.

Εναιώρηση γηγενούς καλλιέργειας κατώτερων φωτοτρόπων είναι το σύνολο των κυττάρων των κατώτερων φωτοτρόπων τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση εναιώρησης στο υγρό θρεπτικό (καλλιεργητικό) μέσο.

Οπτική πυκνότητα εναιώρησης κατώτερων φωτοτρόπων στο μήκος κύματος 750 nm (D_{750}) είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του συντελεστή διαπερατότητας T εναιώρησης στο μήκος κύματος 750 nm.

Παρατήρηση. Ο όρος "οπτική πυκνότητα" χρησιμοποιείται στην βιοτεχνολογική πρακτική με διαφορετική έννοια σε σχέση με τον αρχικό ορισμό, όπως περιγράφεται από τον νόμο των Beer-Lambert-Ber [3]. Παρ' όλα αυτά η περιγραφόμενη διαδικασία χρησιμοποιείται συχνά στην πρακτική της εργαστηριακής καλλιέργειας μικροαλγών σαν γρήγορη μέθοδος μέτρησης της

συγκέντρωσης των κυττάρων [8], μέτρησης των χαρακτηριστικών ανάπτυξης των μικροαλγών [4] κλπ.

Ο σκοπός της μεθόδου.

Το εναιώρημα της γηγενούς καλλιέργειας κατώτερων φωτοτρόπων τοποθετείται στην κρυσταλλική μετρική μεζούρα από χαλαζία του συγκεντρικού φωτοηλεκτροχρωματογράφου και μετράμε το ποσοστό της διαπερατότητας σχετικά με την μεζούρα που περιέχει θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο, που παρουσιάζει μηδενική απορρόφηση, η με αποσταγμένο νερό.

Θεωρητική εισαγωγή.

Ο νόμος του Bugar-Lambert ορίζει την εξάρτηση του ποσού του μονοχρωματικού φωτός που απορροφάται από το υλικό σε σχέση με το πάχος του απορροφητικού στρώματος:

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

όπου I_0 η ένταση του επίπεδου μονοχρωματικού μήκος κύματος φωτός που διαπερνά το υλικό· I είναι η ένταση του επίπεδου μονοχρωματικού μήκους κύματος φωτός στην έξοδο του από το υλικό· το e είναι η βάση του φυσικού λογαρίθμου, l που αντιπροσωπεύει το πάχος του υλικού (cm)· k_λ είναι ο δείκτης απορροφητικότητας του φωτός από το υλικό (cm^{-1}). Ο δείκτης k_λ εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός και την χημική σύσταση και την χημική κατάσταση του υλικού.

Για τα αραιωμένα διαλύματα των απορροφητικών ουσιών στον μη απορροφητικό διαλύτη ισχύει ο νόμος του Ber, ο οποίος ορίζει την άμεση αναλογία μεταξύ της απορροφητικότητας του φωτός από το υλικό (k_λ) και της συγκέντρωσης του υλικού στο διάλυμα (c):

$$k_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c.$$

Συσχετίζοντας του δύο παραπάνω νόμους οδηγούμαστε στον ενοποιημένο νόμο των Buger-Lambert-Ber:

$$I = I_0 \cdot e^{-\kappa \lambda \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot e^{-D_t}$$

Όπου $\kappa \lambda$ είναι ο συντελεστής ο οποίος εξαρτάται από τις ιδιότητες της διαλυμένης ουσίας και από το μήκος κύματος του φωτός· όπου c είναι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας· όπου l είναι το πάχος του απορροφητικού στρώματος. Η τιμή του συντελεστή $\kappa \lambda$ εξαρτάται από την μονάδα μέτρησης που χρησιμοποιούμε για την συγκέντρωση c . Για παράδειγμα αν το c μετριέται σε γρ/λ τότε ο συντελεστής $\kappa \lambda$ θα έχει την τιμή $l/(gr \cdot cm)$. Ο συντελεστής D_t ονομάζεται οπτικό πάχος, ορίζεται ως ποσότητα χωρίς διαστάσεις και εκφράζεται σε μονάδες οπτικού πάχους. (μον. Οπτ. Πάχους). Η αναλογία έντασης του φωτός που διαπέρασε σε σχέση με την αρχική ένταση του φωτός που εκπεμφθηκε ονομάζεται διαπερατότητα και εκφράζεται σε μερίδιο ή σε ποσοστό %:

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

Μεταξύ του οπτικού πάχους και της διαπερατότητας υπάρχει η παρακάτω αναλογία:

$$D_t = -\ln T$$

στην πράξη είναι πιο εύκολη η έκφραση του νόμου των Buger-Lambert-Ber με τον δεκαδικό λογάριθμο επειδή η μείωση της έντασης του φωτός μπορεί να μετρηθεί σε μονάδες που είναι πολλαπλάσια του δέκα και όχι με τον φανταστικό αριθμό e . Στη περίπτωση αυτή ο νόμος των Buger-Lambert-Ber έχει την εξής μορφή:

$$I = I_0 \cdot 10^{-D}; \quad D = -\lg T,$$

όπου το D είναι οπτική πυκνότητα, και μετριέται σε μον. Οπτ. Πυκν. Η οπτική πυκνότητα και το οπτικό πάχος σχετίζονται μεταξύ τους με την εξής αναλογία

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

Στην περίπτωση διάχυσης του φωτός στο οπτικό μη ομοειδές περιβάλλον ο νόμος της μείωσης της δέσμης φωτός είναι ανάλογος με τον νόμο των Buger-Lambert:

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

όπου d_λ είναι ο δείκτης της διάχυσης ο οποίος εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός, το μέγεθος των μορίων που το διαχέουν, τους δείκτες διάθλασης των μορίων και το περιβάλλον όπου τα μόρια αιωρούνται (cm^{-1}), το l παριστάνει το πάχος του υλικού που προκαλεί την διάθλαση (cm). Αν το περιβάλλον διάθλασης ταυτόχρονα απορροφά το φως τότε ο νόμος της μείωσης μονοχρωματικής δέσμης φωτός είναι ανάλογος με τον νόμο των Buger-Lambert:

$$I = I_0 \cdot 10^{-(k_\lambda + d_\lambda)l} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda l},$$

όπου k_λ είναι ο δείκτης απορροφητικότητας, το d_λ είναι ο δείκτης διάχυσης, το $\varepsilon_\lambda = k_\lambda + d_\lambda$ και παριστάνει τον συντελεστή μείωσης του διερχόμενου φωτός (Εξαφάνιση).

Στα κύτταρα των κατωτέρων φωτοτρόπων, το μεγαλύτερο ποσοστό από το απορροφούμενο φως οφείλεται στις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Πέρα από αυτό το φως απορροφάται ταυτόχρονα και από τα δομικά στοιχεία των κυττάρων, μεσοκυτταρικά συστατικά, τις κυτταρικές μεμβράνες, κλπ. Η απορρόφηση του φωτός από τα δομικά συστατικά των κυττάρων η οποία δεν προκαλείται από τις χρωστικές ονομάζεται *μη ειδική απορρόφηση*.

Η διάχυση του φωτός από το εναιώρημα γίνεται ως αποτέλεσμα της περίθλασης της αρχικής δέσμης φωτός λόγω της πολύ υψηλής ετερογένειας των κυττάρων. Όταν χρειαζόμαστε να μετρήσουμε το ποσό της απορροφητικότητας του εναιωρήματος των κυττάρων χρησιμοποιούμε ένα ειδικό όργανο με το εξάρτημα φωτοδιαβαθμισμένης σφαίρας, η οποία κατευθύνει τις διαχεόμενες ακτίνες στον καταγραφέα.

Η συσκευή

- Συγκεντρωτικός φωτοηλεκτροχρωματογράφος KFK-2 (Εργοστάσιο φωτοπτικών της πόλης Ζαγκόρσκι) με ποσοστό λάθους στις μετρήσεις που δεν υπερβαίνει το 1,0%, με εύρος λάθους που δεν υπερβαίνει το 0,3%. Διαθέτει υάλινες μεζούρες πάχους 0,5 cm.

Ενδείξεις μέτρησης

- Συντελεστής διαπερατότητας εναιωρήματος της γηγενούς καλλιέργειας μικροαλγών με χρήση φωτός μήκους κύματος 750 nm, T_{750} .

Τα αντιδραστήρια

1. Απεσταγμένο νερό.
2. NaCl (μαγειρικό άλας).

Οι διαδικασίες.

Η τυπική ανάλυση εκτελείται στα παρακάτω βήματα:

1. Λήψη του δείγματος.
2. Προετοιμασία του δείγματος.
3. Μέτρηση του συντελεστή διαπερατότητας του εναιωρήματος κατωτέρων φωτοτρόπων στα 750 nm.
4. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων.

Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της λήψης του δείγματος και της μέτρησης πρέπει να είναι ελάχιστος (όχι παραπάνω από 5–7 λεπτά).

Λήψη δείγματος. Το εναιώρημα στον φωτοαντιδραστήρα ανακατεύουμε πολύ καλά και παίρνουμε μια μικρή ποσότητα στην

μεζούρα. Ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να είναι λιγότερος από 10 ml.

Προετοιμασία του δείγματος. Αμέσως πριν του την μέτρηση πρέπει να διενεργείται διάλυση για τις πυκνές καλλιέργειες του δείγματος με χρήση ισοοσμωτικού διαλύματος $NaCl^2$ και ακολουθεί η μέτρηση των αποτελεσμάτων. Γιαυτό το σκοπό ανακατεύουμε κάποιο ποσό εναιωρήματος και του $NaCl$ σε μία συγκεκριμένη αναλογία. Την αναλογία διάλυσης την ρυθμίζουμε έτσι ώστε τα αποτελέσματα της μέτρησης του συντελεστή διαπερατότητας να βρίσκονται μέσα στα όρια ακρίβειας της συσκευής.

Μετά την ανάδευση του εναιωρήματος ξεκινάμε την μέτρηση της διαπερατότητας για να αποφύγουμε την συσσωμάτωση των εναιωρούμενων κυττάρων και στην διαδικασία της αραιώσης ελέγχουμε της εξής συνθήκη. Η διαφορά θερμοκρασίας του προστιθέμενου $NaCl$ και του εναιωρήματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 5 βαθμούς. Μετά την μέτρηση το διαλυμένο εναιώρημα στην μεζούρα με το δείγμα απορρίπτεται και δεν επιστρέφεται στην καλλιέργεια.

Προετοιμασία του ισοτονικού διαλύματος $NaCl$. Για την παρασκευή του ισοτονικού διαλύματος $NaCl$ χρησιμοποιούμε μεζούρα με όγκο όχι λιγότερο από ένα λίτρο. Σε 1 λίτρο αποσταγμένο νερό διαλύουμε ποσό $NaCl$ το οποίο μας δίνει διάλυμα το οποίο είναι ισοοσμωτικό (ή ισοτονικό) με το διάλυμα των θρεπτικών αλάτων που χρησιμοποιούμε για την καλλιέργεια. Το διάλυμα θεωρείται έτοιμο όταν έχει διαλυθεί όλο το άλας. Το έτοιμο διάλυμα συντηρείται σε κλειστό δοχείο σε θερμοκρασία 20 βαθμών και όχι πάνω άνω 7 έως 10 ημέρες.

Η μέτρηση του συντελεστή διαπερατότητας του εναιωρήματος των μικροαλγών. Οι μετρήσεις εκτελούνται

²Το $NaCl$ χρησιμοποιείται σαν γενικός ρυθμιστής του διαλύματος. Για την *Spirulina platensis* αντί $NaCl$ μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το διάφανο διάλυμα Ζαρρόυκ.

με φως 750 nm με χρήση γυάλινων μεζουρών πάχους 0,5 εκατοστά, οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στο σετ της συσκευής. Χρησιμοποιούμε πάντα μάρτυρα με συντελεστή διαπερατότητας 100% με στόχο να ελέγξουμε τον δείκτη μηδενικής μέτρησης της συσκευής. Στην μεζούρα του μάρτυρα και στην μεζούρα με το δείγμα βάζουμε αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια εκτελούμε την μέτρηση διαπερατότητας φωτός στα 750 nm. Η ένδειξη της συσκευής θα πρέπει να δείχνει 0%, όταν υπάρχει τέτοια ανάγκη με την βοήθεια των ρυθμιστών καλυμπραρίσματος πρέπει να ρυθμίζουμε τον δείκτη του οργάνου στην ένδειξη 0%, και μετά από αυτό ξεκινάμε τις μετρήσεις των δειγμάτων.

Στην μεζούρα του μάρτυρα βάζουμε αποσταγμένο νερό, πριν από την μέτρηση του προετοιμασμένου δείγματος, αναδευτεί καλά και μετά από αυτό το βάζουμε μέσα στην μεζούρα μέτρησης. Είναι σημαντικό να περνάει ελάχιστος χρόνος μεταξύ της ανάδευσης και της μέτρησης. Προσέχουμε να μην αλλάζει η θέση της μεζούρας κατά την διάρκεια της μέτρησης. (Η απόσταση από την επιφάνεια της μεζούρας μέχρι την μεμβράνη που σκεπάζει το φωτοκύτταρο πρέπει να είναι 6,2 cm).

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων. Επειδή η οπτική πυκνότητα και η διαπερατότητα είναι συσχετισμένες μεταξύ των $D = -\lg T$, για τον υπολογισμό των τελικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιούμε τον παρακάτω τύπο:

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

όπου το D_{750} είναι η οπτική πυκνότητα και το T_{750} είναι το ποσοστό της διαπερατότητας εναιωρήματος στο μήκος κύματος φωτός 750 nm, k είναι ο συντελεστής αραιώσης που γίνεται κατά την προετοιμασία.

Έλεγχος ποιότητας και πιθανά μειονεκτήματα της μεθόδου.

Πρέπει να έχουμε υπόψιν μας όταν χρησιμοποιούμε το συγκεντρωτικό φωτοηλεκτροχρωματογράφο KFK-2, η διαδικασία που περιγράφηκε μας δίνει αποτέλεσμα μικρής ακρίβειας απορροφητικότητας μονοχρωματικής δέσμης φωτός από τις μικροάλγες [3], γιαυτό το λόγο πρέπει να είμαστε προσεκτικοί για το πώς χρησιμοποιούμε τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων. Πρέπει να τονίσουμε επίσης ότι αυτή η συσσωμάτωση κυττάρων μας οδηγεί να κάνουμε λάθος μετρήσεις.

6. Μεθοδολογία της μέτρησης του φάσματος διαπερατότητας του εναιωρήματος της γηγενούς καλλιέργειας της *Spirulina platensis* στη ζώνη ΦΕΑ (ενεργής φωτεινής ακτινοβολίας)

Методика измерения спектра культуры

Τομέας χρήσης.

Η μεθοδολογία περιγράφει την διαδικασία μέτρησης του φάσματος μείωσης της φωτεινής ροής εναιωρήματος της γηγενούς *Spirulina platensis* σε μονάδες οπτικής πυκνότητας στην ζώνη της φωτοσυνθετικά ενεργής φωτεινής ακτινοβολίας (ΦΕΑ). Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται στην μελέτη των οπτικών χαρακτηριστικών των φυτών [1], ιδιαίτερος εναιωρημάτων των μικροαλγών [7].

Ονοματολογία.

Εναιώρημα γηγενούς καλλιέργειας *Spirulina platensis*, είναι το σύνολο των κυττάρων της *Spirulina platensis*, τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση εναιωρήματος σε υγρό θρεπτικό (καλλιεργητικό) μέσον.

Το φάσμα μείωσης εναιωρήματος της *Spirulina platensis*, είναι η σχέση της ποσότητας της μείωσης της ροής του φάσματος του φωτός διαμέσου του εναιωρήματος των κατωτέρων φωτοτρόπων βακτηριδίων, εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας και έχει άμεση σχέση με το μήκος κύματος του φωτός.

Η σημασία της μεθόδου

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές οι οποίες βρίσκονται μέσα στα κύτταρα των κατωτέρων φωτοτρόπων, απορροφούν το φως επιλεκτικά, δηλαδή, ποσότητα του απορροφούμενου φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός.

Η σημασία της μεθοδολογίας.

Το εναιώρημα της γηγενούς καλλιέργειας της *Spirulina platensis* τοποθετείται σε μετρική μεζούρα από κρύσταλλο χαλαζία στο φασματοφωτόμετρο και μετράμε το ποσό μείωσης (διαπερατότητας) σχετικά με την μεζούρα μάρτυρα με το μη απορροφητικό διάλυμα- θρεπτικό (καλλιεργητικό) μέσον ή απεσταγμένο νερό.

Θεωρητική εισαγωγή.

Η θεωρία των Βουγερ-Λαμβερτ- Βερρ, αναφέρεται στην σελίδα 37 του παρόντος εγχειριδίου. Πρέπει να σημειώσουμε ότι στα κύτταρα των κατωτέρων φωτοτρόπων το μέγιστο ποσό του απορροφούμενου φωτός δεσμεύεται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Πέραν από αυτό το φως απορροφάται και από τα δομικά στοιχεία των κυττάρων -πρωτοπλασματικά- συστήματα του κυττάρου, την κυτταρική μεμβράνη κλπ. Η απορρόφηση του φωτός από τα δομικά στοιχεία των κυττάρων, τα ποία δεν έχουν σχέση με τις φωτοσυνθετικές χρωστικές ονομάζεται μη ειδική απορρόφηση.

Η διάχυση του φωτός στο εναιώρημα συμβαίνει ως αποτέλεσμα της διάθλασης της αρχικής δέσμης φωτός λόγω της υψηλής ετερογένειας των κυττάρων. Όταν χρειάζεται να υπολογίσουμε το ποσό απορρόφησης εναιωρήματος κυττάρων χρησιμοποιούμε ένα όργανο με ειδικό εξάρτημα — φωτογενητική σφαίρα — η οποία κατευθύνει τις διαθλώμενες ακτίνες στο φωτοκύτταρο του οργάνου.

Το όργανο

- Αυτοματοποιημένος καταγραφέας SF-2000 (LOMO, Russia) με τις προδιαγραφές: Κλίμακα φάσματος: 200–1100 nm. Ζώνη μετρήσεων φασματικών συντελεστών κατευθυνόμενης διαπερατότητας: από 1–100%. Εύρος σφάλματος όχι πάνω από 1%. Όριο επιτρεπόμενης τιμής μέσης παρέκκλισης τυχαίου σφάλματος του φασματοφωτόμετρου, στις μετρήσεις των φασματικών συντελεστών κατευθυνόμενης διαπερατότητας: 0,2%. Σετ μεζουρών από κρύσταλλο χαλαζία το οποίο συνοδεύει το όργανο.

Οι μονάδες μέτρησης.

- Οι συντελεστές φάσματος της κατευθυνόμενης διαπερατότητας του εναιωρήματος κατωτέρων φωτοτρόπων στην ζώνη φάσματος φωτός 400–800 nm με βήμα 0,1 nm.

Αντιδραστήρια.

Τα αντιδραστήρια αποτελούνται από απεσταγμένο ύδωρ και NaCl (απλό μαγειρικό αλάτι).

Οι μετρήσεις.

Η τυπική ανάλυση εκτελείται σε ορισμένα βήματα όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Λήψη δείγματος·
2. Προετοιμασία δείγματος·
3. Μέτρηση του φάσματος διαπερατότητας του εναιωρήματος κατωτέρων φωτότροπων στην ζώνη ΦΕΑ.

Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί της λήψης του δείγματος και της μέτρησης πρέπει να είναι ελάχιστο (όχι επάνω από 5–7 λεπτά).

Λήψη δείγματος. Το εναιώρημα ανακατεύεται καλά στον φωτοαντιδραστήρα και λαμβάνεται δείγμα στην μεζούρα. Ο ελάχιστος όγκος του δείγματος πρέπει να είναι 10 ml.

Προετοιμασία δείγματος. Πριν από την μέτρηση, οι πυκνές καλλιέργειες πρέπει να αραιώνονται ως εξής: Ένα μέρος εναιωρήματος μικροαλγών αραιώνεται με ισοτονικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου ($NaCl$)³. Η αναλογία επιλέγεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα αποτελέσματα να βρίσκονται στην ζώνη τιμών, με τα οποία χαρακτηρίζονται οι δυνατότητες μετρήσεων του οργάνου, π.χ. Για το SF–2000 η ζώνη επιτρεπόμενων τιμών του φασματικού συντελεστή κατευθυνόμενης διαπερατότητας είναι 1–100% και αντιστοιχεί σε 2–0 μονάδες οπτικής πυκνότητας.

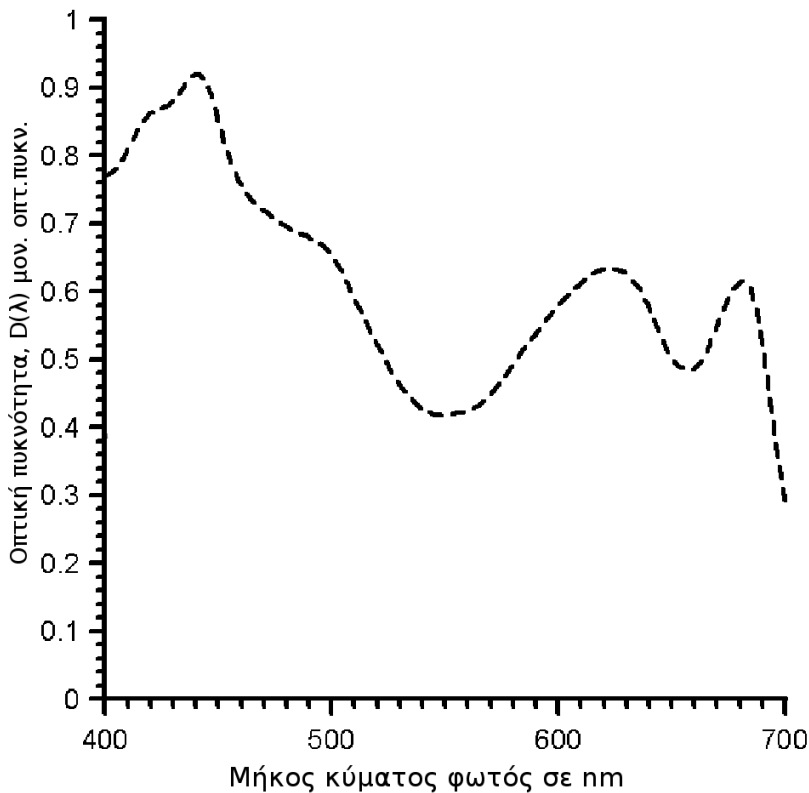
Μετά από την ανάδευση του εναιωρήματος ξεκινάμε τις μετρήσεις μας. Για να αποφύγουμε την συσσωμάτωση των κυττάρων προσέχουμε η διαφορά της θερμοκρασίας του ισοτονικού διαλύματος $NaCl$ και του εναιωρήματος να μην ξεπερνά τους 5°C. Μετά από την μέτρηση το μείγμα του $NaCl$ και του εναιωρήματος δεν επιστρέφει στην αρχική μεζούρα με το δείγμα.

Προετοιμασία του ισοτονικού διαλύματος $NaCl$.

Η λεπτομερής περιγραφή της διαδικασίας αναγράφεται στην σελίδα 41.

Μέτρηση του φάσματος διαπερατότητας του εναιωρήματος . Στην μεζούρα μετρήσεων τοποθετείται δείγμα και εκτελούμε την μέτρηση διαπερατότητας εναιωρήματος της *Spirulina platensis* στη ζώνη φάσματος 400–750 nm. Στην μεζούρα μάρτυρα τοποθετείται απεσταγμένο νερό. Το παράδειγμα του φάσματος της *Spirulina platensis* φαίνεται στην εικόνα 7.

³ $NaCl$ χρησιμοποιείται σαν ρυθμιστής πυκνότητας του διαλύματος



Σχήμα 7. Φάσμα καλλιέργειας *Spirulina platensis*.

7. Μέθοδος διαχωρισμού της βιομάζας σπιρουλίνας από το θρεπτικό ρευστό

Методика фильтрации биомассы спирулины

Που χρησιμοποιείται

Περιγράφεται η μέθοδος η οποία επιτρέπει να μετρήσουμε την συγκέντρωση των κυττάρων της σπιρουλίνας στην καλλιέργεια σε μονάδες γρ/λ. Η μέθοδος αυτή προέρχεται από τις μεθόδους πλανκτολογίας, επιστήμης που ασχολείται με την μελέτη και την συλλογή του φυτοπλαγκτόν [5]. Επίσης η μέθοδος αυτή έχει βρει την χρησιμότητα της και στον τομέα της τεχνικής καλλιέργειας των μικροαλγών. Είναι και πολύ σημαντική κατά την μελέτη των τριχιδίων και των άλλων κυανοπράσινων ειδών αλγών σε εργαστηριακές συνθήκες, αλλά και σε συνθήκες βιομηχανικής παραγωγής. Η μέθοδος είναι απλή στην χρήση χωρίς να απαιτεί μεγάλες δαπάνες ή ειδικό εξοπλισμό.

Ονοματολογία

Η βιομάζα εκφράζεται σε μονάδες μάζας ποσότητας ζωντανού υλικού στην μονάδα εμβαδού ή όγκου περιβάλλοντος που ζεί το υπό εξέταση υλικό (γραμμάρια / μ^2 ή γραμμάρια / λίτρο)

Οι αρχές της ανάλυσης

Η ουσία της μεθόδου είναι ότι το ελαιώρημα των τριχιδίων μικροαλγών τοποθετείται σε χαάνη με χάρτινο φίλτρο ή σε σήτα η οποία έχει διάμετρο κελιών μικρότερο από το μήκος των τριχιδίων. Κατά την πάροδο του χρόνου το υγρό θρεπτικό μέσο αποστραγγίζεται από το φίλτρο/ σήτα (διαδικασία

φιλτραρίσματος), και στο φίλτρο παρατηρείται η συγκέντρωση των κυττάρων των μικροαλγών.

Εξοπλισμός και υλικά

- Ένα δοχείο χωρητικότητας τουλάχιστον ενός λίτρου.
- Ένα στήριγμα για την χοάνη.
- Η χοάνη θα πρέπει να διαθέτει εσωτερική κυματοειδή επιφάνεια η οποία θα στηρίζει το φίλτρο.
- Χάρτινο φίλτρο ή σήτα για συλλογή πλαγκτόν Νο 95 (μέγεθος κελιού 0,1 mm).

Αντιδραστήρια

Απεσταγμένο νερό

Προκαταρκτικές εργασίες

Φίλτρο. Τετράγωνο φύλλο χαρτιού φιλτραρίσματος με απαιτούμενες διαστάσεις (σχετικές με τις διαστάσεις της χοάνης και την πυκνότητα της καλλιέργειας), το οποίο διπλώνεται σε δύο (διπλώνεται κατακόρυφα) και αμέσως μετά στα τέσσερα (διπλώνεται οριζόντια), στην συνέχεια κόβουμε με το ψαλίδι την επάνω άκρη της σχηματισμένης χοάνης σε ημικυκλικό σχήμα. Για να αποκτήσουμε ένα κυματοειδές φίλτρο εκτελούμε διαδοχικά διπλώματα έτσι ώστε οι πτυχές του χαρτιού να συμπίπτουν με τις κυματοειδείς πτυχές της γυάλινης χοάνης.

Με χρήση του υφάσματος για το πλαγκτόν εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία.

Η γυάλινη χοάνη αυτή σταθεροποιείται στο στήριγμα, και εντός της τοποθετείται το φίλτρο ελαφρώς υγρό. Στην συνέχεια για να επιταχύνουμε την διαδικασία του φιλτραρίσματος επιμηκύνουμε

τον γυάλινο σωλήνα της χοάνης με την τοποθέτηση ενός καουτσουκένιου σωλήνα.

Για να γεμίζει γρήγορα ο σωλήνας με το θρεπτικό ρευστό η εσωτερική διάμετρος δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 3 mm. Είναι χρήσιμο ο σωλήνας της χοάνης να διαθέτει μια θηλιά η οποία διευκολύνει το γέμισμα του σωλήνα με θρεπτικό ρευστό.

Διαδικασίες

Μετά την πάροδο 10–15 λεπτών από την λήψη του δείγματος του εναιωρήματος μικροαλγών το δείγμα τοποθετείται στην χοάνη με το φίλτρο. Αυτός ο χρόνος απαιτείται για την εκτίμηση της ταχύτητας της συγκόλλησης των κυττάρων. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση συγκόλλησης των κυττάρων τόσο πιο εύκολη θα είναι η διαδικασία φιλτραρίσματος. Σε ανάγκη μπορούμε να μεγαλώσουμε τον χρόνο έως 30 λεπτά.

Παρατήρηση. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία του εναιωρήματος, τόσο λιγότερο χρονικό διάστημα έχουμε στην διάθεση μας, επειδή με υψηλές θερμοκρασίες η λύση των κυττάρων οδηγεί σε απώλεια του ενδοπλασματικού περιεχομένου στο περιβάλλον και σε μεγάλο βαθμό θα δυσκολεύει την διαδικασία του φιλτραρίσματος.

Ο σφιγκτήρας στο τελικό άκρο της χοάνης ρυθμίζει την ταχύτητα φιλτραρίσματος και εμποδίζει την είσοδο φυσαλίδων αέρα στο σωλήνα της χοάνης.

Στο τέλος της διαδικασίας φιλτραρίσματος η συμπυκνωμένη βιομάζα ξεπλένεται από τα άλατα που περιέχονται στο θρεπτικό μέσο, με μικρές ποσότητες απεσταγμένου νερού⁴ που την περιχύνουμε. Ο όγκος του απεσταγμένου νερού δεν πρέπει να υπερβαίνει 1,5–2 όγκους της συμπυκνωμένης βιομάζας, σε αντίθετη περίπτωση είναι πιθανή η απώλεια μέρους της βιομάζας

⁴Σε επόμενη αποξήρανση της βιομάζας σε θερμοκρασία πάνω από 40°C αντί απεσταγμένο νερό χρησιμοποιούμε ισοτονικό διάλυμα $(NH_4)_2CO_3$ [3].

λόγω της λύσης των κυττάρων. Μετά από την αποξήρανση της βιομάζας πάνω στο φίλτρο με βάση την διαφορά βάρους πριν το φιλτράρισμα και μετά από αυτό μπορούμε να εξετάσουμε την πυκνότητα στον φιλτραρισμένο όγκο ελαιωρήματος.

Έλεγχος ποιότητας και πιθανά μειονεκτήματα της μεθόδου.

Για την λήψη της υψηλότερης ποιότητας βιομάζας η πάστα ξεπλένεται από τα άλατα του θρεπτικού διαλύματος τόσες φορές ώστε το pH του απορριπτόμενου υγρού πρέπει να κυμαίνεται από 7-7,5. Σε περίπτωση ανώτερου pH τότε θα πρέπει να επαναλάβουμε την έκπλυση.

Введение

Данное руководство представляет собой начальный этап работы по греческо-украинскому проекту промышленного производства высококачественной биомассы спирулины. Спирулина — микроскопическая водоросль, которая привлекает к себе всё большее внимание как объект биотехнологии. Её биомасса обладает уникальными свойствами, благодаря содержанию некоторых биохимических компонентов, аналогов которому среди других организмов на Земле не существует. Всё большее применение микроводоросли и продукты их биосинтеза находят в современной деятельности человека: в медицине, животноводстве, сельском хозяйстве, очистке сточных вод, парфюмерии и пр. В связи с увеличением спроса на биомассу микроводорослей и на продукты из неё уже сегодня возникает необходимость в разработке высокопродуктивных технологий производства биомассы микроводорослей в управляемых условиях. Для некоторых видов водорослей такие технологии уже есть. Например, сине-зелёную микроводоросль *Spirulina platensis* более полувека выращивают в искусственных водоёмах во многих странах мира.

Успех в культивировании микроводорослей в промышленных масштабах во многом определяется уровнем знаний об объекте культивирования, его биологии, ростовых характеристиках. Особенно важна глубина знаний при производстве высококачественных продуктов. Зачастую в работе с биологическими объектами выбор технологии опирается на практический опыт и интуицию. Однако такой подход не позволяет получать биомассу с заранее заданным качеством.

Краткое руководство призвано помочь тем, кто желает повысить своей теоретический уровень в области культивирования микроводорослей.

1. Паспорт штамма *Spirulina*

(Ταυτότητα του στελέχους Σπιρουλίνα)

Научное наименование вида.

Arthrospira platensis (Nordstedt) Gomont, 1892.

Синонимы.

Spirulina platensis (Nordstedt) Geitler, 1925; *Spirulina jenneri* var. *platensis* Nordstedt, 1884.

Таксономия.

Cyanobacteria; Cyanophyceae; Oscillatoriophyceae; Oscillatoriales; Phormidiaceae; Phormidioideae.

Учреждение, где хранится.

Институт биологии южных морей (ИнБЮМ, г. Севастополь) НАНУ, отдел биотехнологий и фиторесурсов, отдел экологической физиологии микроводорослей.

Происхождение штамма.

Реактивирован из таблеток (производство Индии) в 1996 г.

Кто и где идентифицировал штамм.

Алисиевич А. В., 1996 г, отдел биотехнологий и фиторесурсов, ИнБЮМ.

Последнее определение.

Алисиевич А. В., 2006 г, отдел биотехнологий и фиторесурсов, ИнБЮМ.

Характеристика.

Филаментная сине-зелёная прокариотическая микроводоросль (цианобактерия), интенсивно развивающаяся в богатых карбонатами и гидрокарбонатами тропических и субтропических водах. Вид планктонный, обладает самой высокой среди всех групп фитопланктонных организмов толерантностью к рН, солёности и температуре. Термофил .

Морфология.

Клетки имеют низкий уровень клеточной дифференциации (отсутствуют истинное ядро, хроматофоры, ядрышки, вакуоли, митохондрии, эндоплазматическая сеть и т. д.). Трихомы прямые палочковидные, с закругленными концами, окружены слизистым чехлом и способны к поступательному скользящему и вращательному движениям. Клетки цилиндрические, плотно примыкают друг к другу. Перегородки между клетками заметны.

Морфометрия.

Измерено 50 клеток 50-и трихомов микроводоросли штамма IBSS-30, средние значения которых: ширина клетки — $6,69 \pm 0,16$ мкм, высота клетки — $3,87 \pm 0,14$ мкм, средняя длина трихомов — $422,80 \pm 48,91$ мкм, объём клетки — $136,81 \pm 8,04$ мкм³, площадь поверхности клетки — $152,08 \pm 5,97$ мкм², индекс сферичности — $0,84 \pm 0,006$.

Среда культивирования.

Заррук.

Область применения.

Биотехнология, широко применяется как источник ряда биологически активных веществ, в косметической, медицинской и пищевой промышленности.

Примечания.

При интенсивном выращивании спиральные формы отсутствуют. После пересева штамма наблюдается статистически достоверное ($P=95\%$) снижение средней длины трихомов и увеличение индекса сферичности клеток. Таксономия и синонимика приведены в соответствии со Всемирным каталогом морских видов (WoRMS) <http://www.marinespecies.org/>

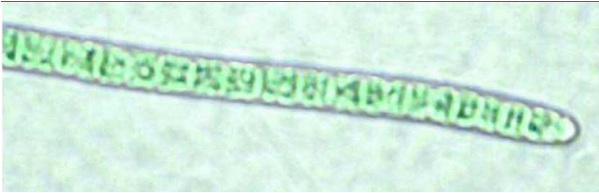
Библиография.

[2, 6, 11, 12].

Фигура, к которой приравнивается форма клетки.

Круглый прямой цилиндр.

Фотография.



2. Приготовление питательной среды Заррук

Σύνθεση του διαλύματος Ζαρρουκ

Область и диапазон применения

Питательная среда Заррук используется в практике лабораторного и полупромышленного культивирования прокариотической сине-зелёной микроводоросли *Spirulina platensis* Geitl. [13].

Терминология

Минеральная питательная среда для микроводорослей — водный раствор минеральных солей, содержащий все необходимые для жизнедеятельности водорослей вещества.

Оборудование

1. Стеклянный стакан объёмом 1 л для среды;
2. Стеклянный стакан объёмом 1 л для микроэлементов;
3. Пипетка 10 мл; погрешность $\pm 0,1$ мл;
4. Весы аналитические с погрешностью взвешивания не более $\pm 0,001$ г.

Реактивы

Таблица 1: Перечень солей среды Заррук.

| № | Наименование | г/л | Класс |
|----|------------------------|--------|-------|
| 1 | $NaHCO_3$ | 16,8 | хч |
| 2 | K_2HPO_4 | 0,5 | хч |
| 3 | $NaNO_3$ | 2,5 | хч |
| 4 | K_2SO_4 | 1,0 | хч |
| 5 | $NaCl$ | 1,0 | хч |
| 6 | $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,2 | хч |
| 7 | $CaCl_2$ | 0,042 | хч |
| 8 | $FeSO_4 \times 7H_2O$ | 0,01 | хч |
| 9 | Na_2EDTA | 0,08 | хч |
| 10 | Раствор микроэлементов | 1 мл/л | |

Таблица 2: Раствор микроэлементов.

| | Наименование | г/л | Класс |
|---|-----------------------|-------|-------|
| 1 | H_3BO_3 | 2,86 | хч |
| 2 | $MnCl_2 \times 4H_2O$ | 1,81 | хч |
| 3 | $ZnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,222 | хч |
| 4 | $CuSO_4 \times 5H_2O$ | 0,08 | хч |
| 5 | MoO_3 | 0,015 | хч |
| 6 | NH_4VO | 0,023 | хч |
| 7 | $CoCl_2$ | 0,044 | хч |
| 8 | $K_2Cr_2SO_4$ | 0,096 | хч |

Замечание. Для лабораторных исследований среду готовят с использованием дистиллированной воды, для условий

производства возможно использование водопроводной воды.

Ход работы

Навески солей, перечисленные в таблице 1, последовательно растворяются в воде. Следует соблюдать данный порядок растворения солей.

1. В 0,9 л воды растворяют 16,8 г $NaHCO_3$. Растворение считается полным после того, как раствор станет практически прозрачным;
2. Затем, последовательно растворяются соли №2–9 приведённые в таблицы 1 и добавляется раствор микроэлементов;
3. Объём доводят дистиллированной водой до 1 л. Через 30–60 мин питательная среда готова для использованию.

Раствор микроэлементов готовят заранее, последовательно растворяя в 1 л воды навески солей, перечисленных в таблице 2.

Контроль качества

Качество среды подтверждается прозрачностью раствора, отсутствием осадка, отсутствием альгофлоры при микроскопировании.

Расчёт питательной среды для спирулины

Η Μέτρηση των ανόργανων στοιχείων

Расчёт питательной среды для спирулины производится в соответствии с содержанием химических элементов в клетках микроводорослей. В таблице 3 приведены средние концентрации неорганических веществ в 1 г биомассы.

Таблица 3: Средние значения содержания химических элементов в биомассе *Spirulina patensis*.

| Компонент | Содержание в биомассе, мг/г |
|---------------|-----------------------------|
| Углерод (C) | 500 |
| Азот (N) | 106,8 |
| Фосфор (P) | 11,4 |
| Калий (K) | 18,8 |
| Натрий (Na) | 17,4 |
| Железо (Fe) | 0,945 |
| Кальций (Ca) | 0,11 |
| Магний (Mg) | 3,5 |
| Микроэлементы | |
| Бор (B) | |
| Марганец (Mn) | 0,064 |
| Цинк (Zn) | 0,028 |
| Медь (Cu) | 0,015 |
| Молибден (Mo) | |
| Кобальт (Co) | 0,0015 |
| Хром (Cr) | 0,005 |

Приведённые значения содержания неорганических элементов в биомассе являются потребностями (экономическими коэффициентами) спирулины в данных веществах. Таким образом, для получения 1 г биомассы в питательную среду необходимо добавить указанные в таблице 3 количества неорганических элементов.

Произведём расчёт концентрации солей по прописи среды Заррук для получения 1 г биомассы:

1. Углерод (C). Углерод добавляется в среду в форме гидрокарбоната натрия $NaHCO_3$ (пищевая сода). Расчитаем молярную массу данной соли: $M(NaHCO_3) = 23 + 1 + 12 + 16 \times 3 = 84$. Молярная масса углерода $M(C) = 12$. Тогда массовая доля углерода в данной соли составляет $w(C) = 12/84 = 1/7$. Таким образом, для получения одного грамма биомассы в питательную среду необходимо добавить $0,5 \times 7 = 3,5$ г гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$). В состав среды Заррук входит 16,8 г/л $NaHCO_3$, следовательно, из одного литра питательной среды (по углероду) можно получить $16,8/3,5 = 4,8$ г биомассы спирулины.
2. Фосфор (P). Фосфор добавляется в среду в форме $K_2HPO_4 \times 3H_2O$. Расчитаем молярную массу данной соли: $M(K_2HPO_4 \times 3H_2O) = 39 \times 2 + 1 + 32 + 4 \times 16 + 3 \times 18 = 229$. Молярная масса фосфора $M(P) = 32$. Тогда массовая доля фосфора в данной соли составляет $w(P) = 32/229 = 1/7,16$. Таким образом, для получения одного грамма биомассы в питательную среду необходимо добавить $11,4 \times 7,16 = 81,58$ мг $K_2HPO_4 \times 3H_2O$. В состав среды Заррук входит 0,66 г/л $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, следовательно, из одного литра питательной среды (по фосфору) можно получить $0,66 \text{ г} / 81,58 \text{ мг} = 8,1$ г биомассы

спирулины.

3. Азот (N). Азот добавляется в среду в форме нитрата натрия $NaNO_3$. Расчитаем молярную массу данной соли: $M(NaNO_3) = 23 + 14 + 16 \times 3 = 85$. Молярная масса азота $M(N) = 14$. Тогда массовая доля азота в данной соли составляет $w(N) = 14/85 = 1/6,07$. Таким образом, для получения одного грамма биомассы в питательную среду необходимо добавить $106,8 \times 6,07 = 648,43$ мг нитрата натрия ($NaNO_3$). В состав среды Заррук входит 2,5 г/л $NaNO_3$, значит, из одного литра питательной среды (по азоту) можно получить $2,5/0,64843 = 3,855$ г биомассы спирулины.

4. Железо (Fe). Железо добавляется в среду в форме $FeSO_4 \times 7H_2O$. Расчитаем молярную массу данной соли: $M(FeSO_4 \times 7H_2O) = 278$. Молярная масса железа $M(Fe) = 56$. Тогда массовая доля железа в данной соли составляет $w(Fe) = 56/278 = 1/4,96$. Таким образом, для получения одного грамма биомассы в питательную среду необходимо добавить $0,945 \times 4,96 = 4,68$ мг $FeSO_4 \times 7H_2O$. В состав среды Заррук входит 10 мг/л $FeSO_4 \times 7H_2O$, значит из одного литра питательной среды можно получить $10/4,68 = 2,13$ г биомассы спирулины.

Замечание. Следует отметить, что соль $FeSO_4 \times 7H_2O$ растворяется в отдельной ёмкости вместе с Na_2EDTA , что позволяет образоваться комплексу, который может быть усвоен клетками водорослей. Количество добавляемого Na_2EDTA (по прописи среды Заррук) должно в 8 раз превышать количество добавленного железа.

5. Кальций (Ca). Кальций добавляется в среду в форме $CaCl_2 \times 2H_2O$. Расчитаем молярную массу данной

соли — $M(CaCl_2 \times 2H_2O) = 146$. Молярная масса кальция: $M(Ca) = 40$. Тогда массовая доля кальция в данной соли составляет $w(Ca) = 40/146 = 1/3,65$. Таким образом, для получения одного грамма биомассы в питательную среду необходимо добавить $11 \times 3,65 = 40,15$ мг $CaCl_2 \times 2H_2O$. В состав среды Заррук входит 1 мг/л $CaCl_2 \times 2H_2O$, значит, из одного литра питательной среды можно получить около 1 г биомассы спирулины.

6. Магний (Mg). Магний добавляется в среду в форме $MgSO_4 \times 7H_2O$. Расчитаем молярную массу данной соли: $M(MgSO_4 \times 7H_2O) = 246$. Молярная масса железа $M(Mg) = 24$. Тогда массовая доля магния в данной соли составляет $w(Mg) = 1/10,25$. Таким образом, для получения одного грамма биомассы в питательную среду необходимо добавить $3,5 \times 10,25 = 35,875$ мг $MgSO_4 \times 7H_2O$. В состав среды Заррук входит 200 мг/л $MgSO_4 \times 7H_2O$, значит, из одного литра питательной среды максимально можно получить 5,57 г биомассы спирулины.
7. Калий (K) и натрий (Na). Потребности водорослей в Na и K полностью удовлетворяется при добавлении солей $NaHCO_3$ (см. пункт 1) и $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ (см. пункт 2). Добавление хлорида натрия производится с целью повышения общей солёности среды, а сульфата калия — с целью внесения в среду источника серы (см. таблицу 1 на стр. 58).

Замечание 1. Расчёт концентраций микроэлементов производится аналогично.

Замечание 2. Любую соль — как источник биогенного элемента — в питательной среде можно заменить на другой источник того же биогенного элемента. Например, 2,5 г/л $NaNNO_3$ — источник азота — можно заменить на 2,1 г/л KNO_3 .

3. Метод накопительных культур (периодическая культура)

Μέθοδος συσσωρευτικών καλλιέργειών
(περιοδική καλλιέργεια)

Область и диапазон применения

Традиционно большинство альгологов в своих исследованиях используют метод накопительных культур. Метод находит своё применение в гидробиологической практике при изучении влияния каких-либо факторов на процессы роста, биосинтеза и пр. Особое место он занимает в работе с коллекцией культур микроводорослей, например, для создания и сохранения альгологически чистых культур.

Терминология

Методом накопительных культур называется способ выращивания микроводорослей, при котором в освещаемый культиватор, заполненный питательной средой, вносят небольшое количество клеток микроводорослей (инокулят). Со временем в результате роста микроводорослей (накопление) их концентрация достигает некоторой максимальной величины, т. е. наступает момент, когда увеличение плотности становится невозможным в связи с ограничением роста элементами минерального питания, либо интенсивностью света, либо накоплением метаболитов, либо другими физико-химическими условиями среды. В дальнейшем полученную таким образом культуру используют в качестве инокулята.

Теоретическое введение

Типичная картина динамики плотности периодической культуры микроводорослей представлена на рисунке 1 на странице 68. Накопительную кривую роста условно разделяют на несколько периодов (фаз) роста, характеризующихся определёнными величинами кинетических параметров. Сопровождая нумерацией каждый период роста, дадим краткое его описание [10].

1. Лаг-фаза. Как правило, для первоначального периода роста и развития культуры характерно либо отсутствие роста, либо скорость роста отрицательна. При этом происходит уменьшение числа клеток или биомассы B . 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. Динамика плотности культуры в этой фазе описывается выражением:

$$B = B_0 \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-t_0)}, \quad (1)$$

где μ_r — удельная скорость темнового дыхания (расхода биомассы на поддержание структуры); t — время; B_0 — биомасса в начальный момент времени t_0 .

2. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза. Величина удельной (относительной) скорости роста μ в этой фазе роста определяется, в основном, световыми условиями, которые для низких плотностей культуры неизменны, т. к. клетки не затеняют друг друга. Этот период характеризуется постоянством удельной скорости роста: $\mu = \mu_m = const$. Для логарифмической фазы роста применима зависимость плотности культуры от времени в следующем виде:

$$B = B_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t-t_{ln})}, \quad (2)$$

где μ_m — максимальная удельная скорость роста; B_{ln} — плотность культуры в момент времени t_{ln} .

3. Фаза линейного роста. Практически всегда на кривой роста микроводорослей можно выделить прямолинейный участок. Это указывает на постоянство абсолютной скорости роста (продуктивности культуры, $P = P_m = const$). Как правило, на линейном участке скорость роста определяется величиной поступления углекислого газа, который полностью поглощается культурой и ограничивает продуктивность культуры в целом. Для фазы линейного роста зависимость биомассы от времени записывается в следующем виде:

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l), \quad (3)$$

где B_l — плотность культуры в момент начала линейной фазы t_l .

4. Фаза замедления. Фаза замедления роста характеризуется тем, что абсолютная скорость роста на этом участке накопительной кривой уменьшается. Это замедление может быть вызвано двумя причинами. В одном случае происходит смена лимитирующего фактора, т. е. концентрация какого-либо биогенного элемента в среде уменьшается до уровня, при котором скорость синтеза определяется уже данным элементом, согласно кинетике Михаелиса-Ментен. В конце фазы скорость роста снизится до нуля. В другом случае плотность культуры достигает величины, при которой скорость синтеза, определяемая внешним потоком субстрата, становится сравнимой со скоростью дыхания культуры, т. е. в конце фазы замедления культура достигает компенсационного пункта фотосинтеза. Эта фаза характеризуется постоянством удельной скорости дыхания $\mu_r = const$. Для фазы замедления зависимость биомассы от времени записы-

ваются в следующем виде:

$$B = B_m + (B_m - B^l) \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-t^l)}, \quad (4)$$

где B_m — плотность культуры в стационарной фазе; B^l — плотность культуры в конце линейной фазы t^l .

5. Стационарная фаза. Характеризуется прекращением роста микроводорослей ($\mu = 0, P = 0$). Культура достигает максимальной плотности B_m величина, которая 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. Для описания динамики биомассы в этой фазе используется выражение:

$$B = B_m, \quad (5)$$

где B_m — концентрация биомассы на стационарной фазе.

6. Фаза отмирания. В фазе отмирания наблюдается превалирование процессов дыхания над процессами синтеза. Скорости роста (отрицательные) будут равны скоростям распада. В фазе отмирания происходят глубокие физиологические изменения клеток микроводорослей, вплоть до их гибели. Происходит распад биомассы, что, как правило, приводит к развитию бактерий. Возникает некий новый альго-бактериальный ценоз, т.е. культура микроводорослей прекращает существование. Если культуру микроводорослей в этой фазе использовать в качестве инокулята для новой периодической культуры, то часть клеток не сможет восстановиться к нормальной жизнедеятельности. Уравнение динамики плотности культуры в фазе отмирания аналогично уравнению (1) для лаг-фазы:

$$B = B_m \cdot e^{-\mu_r \cdot (t-t^s)}, \quad (6)$$

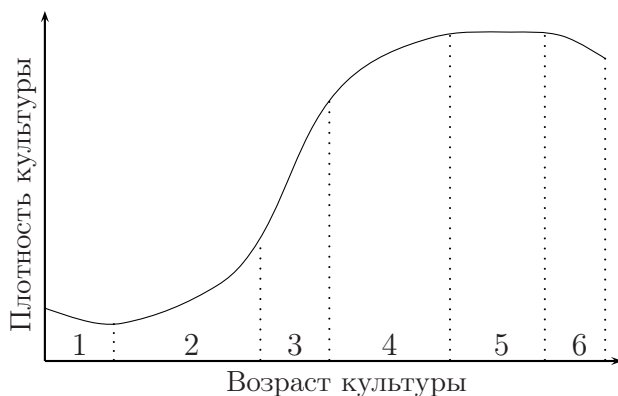


Рис. 1. Динамика накопления биомассы или концентрации клеток в периодической культуре микроводорослей. Штриховыми линиями обозначены условные границы фаз роста культуры: 1 — лаг-фаза, 2 — логарифмическая фаза, 3 — линейная фаза, 4 — фаза замедления роста, 5 — стационарная фаза, 6 — фаза отмирания.

где μ_r — удельная скорость темнового дыхания; B_m — плотность культуры в стационарной фазе; t^{st} — время окончания стационарной фазы.

Пример расчёта величин удельной скорости роста и продуктивности по экспериментальным данным

Η Μέτρηση των ανόργανων στοιχείων

Постановка задачи

Проследить динамику роста *Spirulina platensis* в накопительной культуре. По экспериментальным данным рассчитать величину удельной скорости роста и продуктивности.

Объект исследования

Подробное описание объекта исследования приведено на странице 54.

Терминология

Биомасса (от био. . . и лат. massa — ком, кусок) — выраженное в единицах массы количества живого вещества, приходящееся на единицу площади или объёма местообитания (г/м² или г/л).

Приборы

1. Весы электронные «Sartorius», 2-го класса, с погрешностью $\pm 0,001$ г;
2. Иономер лабораторный И-160М с ионоселективным электродом ЭЛИС 121 NO_3 . Абсолютная погрешность

прибора не превышает 0,001 г/л. ГОСТ 22261-94;

3. Аквариумный компрессор «Махіма», производительность 4,8 л/мин;
4. Ртутный термометр 0-50°C, с погрешностью $\pm 0,5$;
5. Люксметр Ю-116 с погрешностью не более 5% от измеряемой величины;
6. Дозаторы «Biohit», 1000–5000 мкл, $\pm 1\%$; 10–100 мкл, $\pm 1,5$ –2,5%; 200–1000 мкл, ± 1 –1,5%.

Посуда

1. Пробирки на 10 мл;
2. Цилиндр 1000 мл;
3. Стеклянные стаканы 0,5 л.

Питательная среда

Порядок приготовления и состав питательной среды приведён в таблице 1 на странице 58.

Измеряемые величины

1. Оптическая плотность культуры *S. platensis* на длине волны 750 нм, (D_{750});
2. pH;
3. Температура, t°C.

Условия проведения эксперимента

Для выращивания *S. platensis* использовали культиватор плоско-параллельного типа из стекла объёмом 2 литра, в условиях круглосуточного освещения. В качестве источника света использовали систему ламп ЛД-40 средняя освещённость 10 клк. Суспензию микроводорослей барботировали воздухом с помощью аквариумного компрессора «Maxima». Общий вид системы культивирования *S. platensis* представлен на рисунке 2.

Порядок проведения эксперимента

В культиватор был внесён инокулят и питательная среда в таком количестве, чтобы начальная оптическая плотность культуры составляла $D_{750} = 0,056$. На протяжении всего эксперимента отбор проб проводили ежедневно в 11.00. Отключали подачу воздуха и измеряли температуру и рН в культиваторе. Перед отбором проб уровень суспензии в культиваторе доводили до метки 2 л дистиллированной водой для компенсации испарения. После тщательного перемешивания суспензии микроводорослей ручной мешалкой проводили отбор проб объёмом 2 мл для измерения оптической плотности *S. platensis*. Плотные культуры разбавляли питательной средой непосредственно перед измерением. Для отбора проб использовали дозатор «Biohit» на 1-5 мл. После измерений пробы в культиватор не возвращали.

Порядок измерений

Для каждого показателя ежедневно проводили однократное измерение. Ниже приведён порядок действий во время измерений:

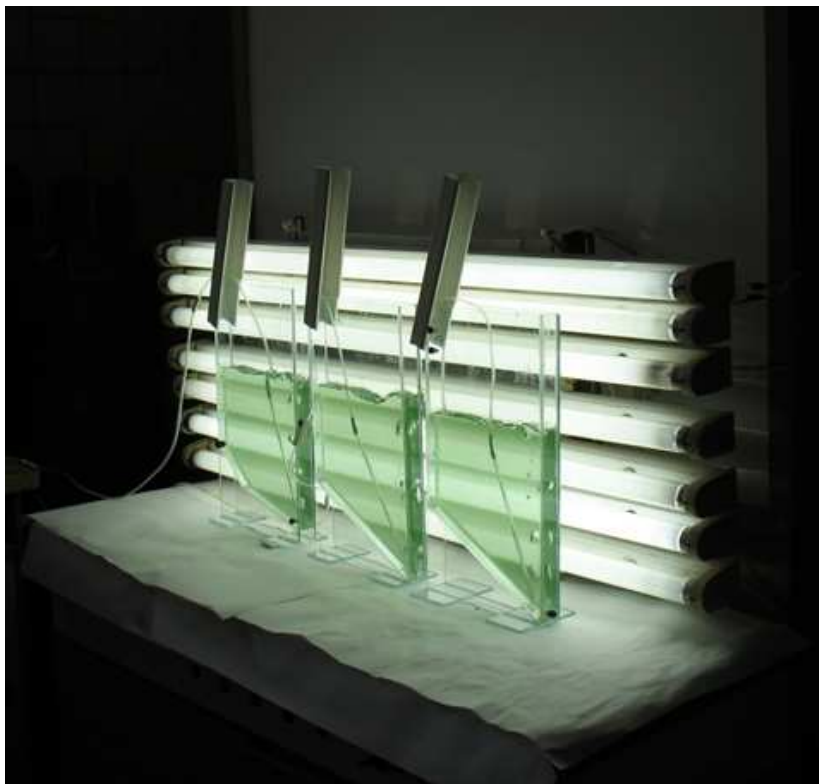


Рис. 2. Общий вид системы культивирования *S. platensis*

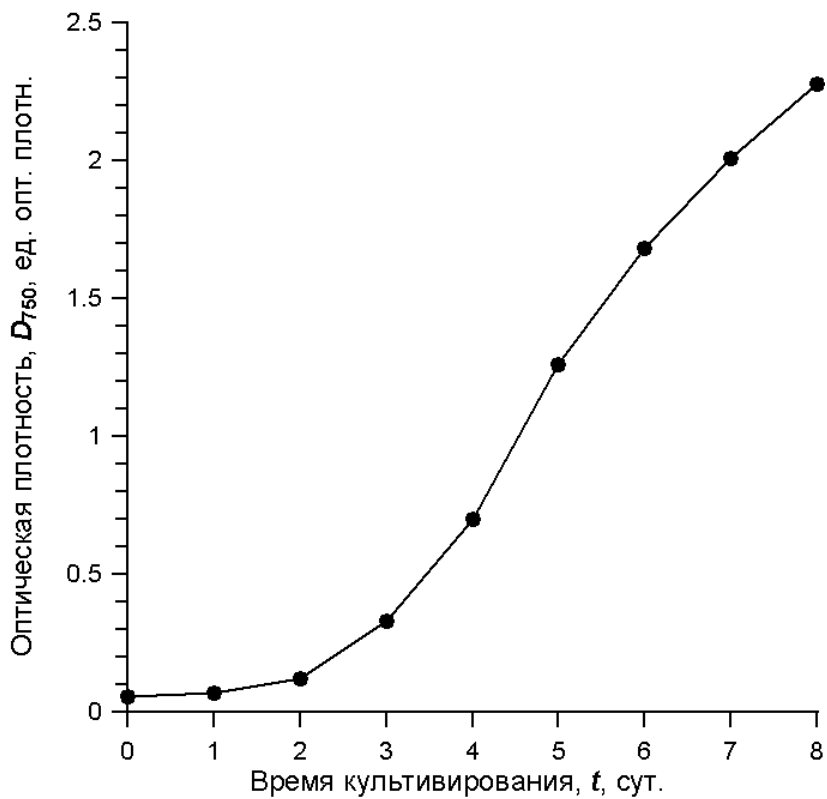
1. Измерение освещённости. Т. к расстояние от культиватора до лампы освещения во время всего эксперимента оставалось постоянным, освещённость измеряли однократно в начале эксперимента;
2. Измерение температуры среды;
3. Измерение рН среды;
4. Отбор проб из культиватора;
5. Измерение оптической плотности *S. platensis* на длине волны 750 нм; В качестве контроля использовали дистиллированную воду, которая по оптической плотности не отличалась от среды культивирования. Плотные культуры разбавляли питательной средой непосредственно перед измерением.

Экспериментальные данные по динамике роста *Spirulina platensis* представлены в таблице 3 и на рисунке 3.

Все расчёты параметров накопительных кривых будем проводить в единицах оптической плотности, опираясь на тот факт, что величина оптической плотности культуры D_{750} и концентрация клеток B связаны линейной зависимостью $D_{750} = k \cdot B$ [3].

Проведём расчёты для накопительной кривой, представленной на рисунке 3.

Фазы роста. Форма накопительной кривой есть характеристика культиватора, кинетических характеристик культуры и заданных внешних условий, при которых выращивали микроводоросли (освещённости, минеральных компонентов и др.). Первым шагом в определении параметров любой накопительной кривой является установление границ различных фаз роста. К сожалению, в этом вопросе не существует общепризнанных формальных приёмов и поэтому вся

Рис. 3. Динамика биомассы *S. platensis*

ответственность данной процедуры принадлежит исследователю. Ясно, что если разбиение накопительной кривой на фазы роста будет ошибочным, то и все последующие расчёты будут некорректными.

Будем считать, что накопительная кривая, представленная на рисунке 3 состоит из двух фаз роста: логарифмическая фаза (с 0 по 3 сутки) и линейная фаза роста (с 3 по 8 сутки).

Расчёт максимальной удельной скорости роста. Для расчёта максимальной удельной скорости роста μ_m необходимо использовать данные логарифмической фазы роста и уравнение (2).

Проведём через экспериментальные точки данного участка накопительной кривой функцию (см. выражение (2))

$$D(t) = D_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \quad (7)$$

подбирая коэффициенты D_{ln} и μ_m таким образом, чтобы сумма квадратов расстояний от экспериментальных точек до кривой была минимальной¹. Расчёт коэффициентов D_{ln} и μ_m по уравнению (7) для данных, представленных на рисунке 4, дал следующие значения:

$$D(t) = D_{ln} \cdot e^{\mu_m \cdot (t-t_{ln})} = 0,03 \cdot e^{0,8 \cdot (t-0)} \quad (8)$$

Расчёт продуктивности. Для расчёта величины максимальной продуктивности (P_m) необходимо использовать данные линейной фазы роста и уравнение (3).

Расчитаем коэффициенты уравнения (9) для линейного участка (см. рис. 5). Имеем:

$$D(t) = D_l + P_m \cdot (t - 3) = 0.84 + 0.4 \cdot (8 - 3) \quad (9)$$

¹Эти расчёты обычно проводят используя вычислительную машину с математической программой, в которой реализован статистический метод наименьших квадратов.

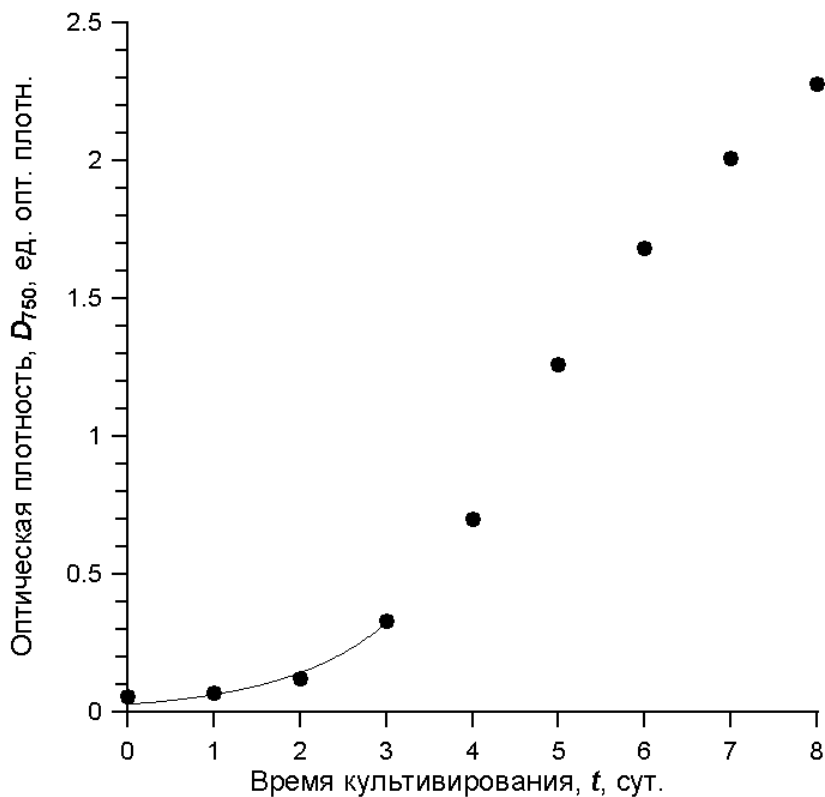


Рис. 4. Расчёт величины максимальной удельной скорости роста *S. platensis* по уравнению (8).

Тангенс угла наклона линейной зависимости в координатах $D - D_l$ и $t - t_l$ численно равен величине P_m , т.е. $P_m = 0,4 \text{ г} \cdot (\text{л} \cdot \text{сут})^{-1}$.

Таким образом, по экспериментальным данным рассчитаны значения максимальной удельной скорости роста:

$$\mu_m = 0,8 \text{ сут}^{-1}$$

и максимальной продуктивности:

$$P_m = 0,4 \text{ г} \cdot (\text{л} \cdot \text{сут})^{-1}.$$

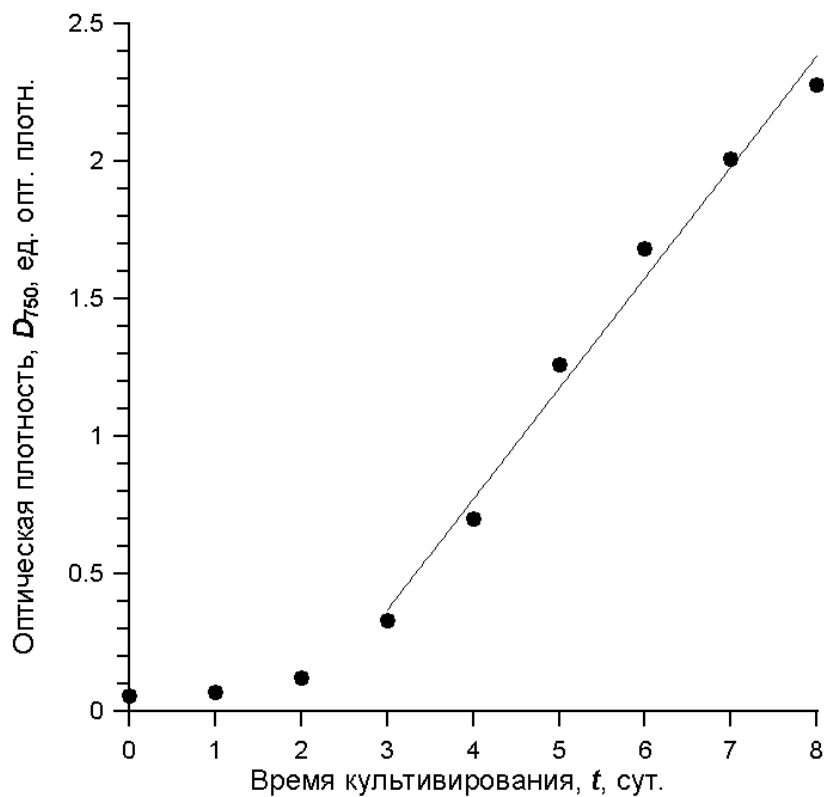


Рис. 5. Расчёт величины максимальной продуктивности *S. platensis* по уравнению (9).

4. Метод пропорционально проточных культур (квазинепрерывная культура)

Αναλογική μέθοδος συνεχούς καλλιέργειας

Область и диапазон применения.

Так или иначе, при использовании метода накопительных культур в своих исследованиях экспериментатор не может избежать своего вмешательства в процесс роста микроводорослей, поскольку для слежения за изменениями каких-либо показателей: плотности культуры, биохимического состава биомассы и пр. — необходим отбор проб, т. е. изъятие некоторого объема суспензии. При этом зачастую возвращение пробы в культиватор невозможно, поэтому приходится искать компромисс между интервалами отбора проб, объемом проб и рабочим объемом культуры.

Метод накопительных культур является частным случаем другого метода — метода квазинепрерывных (проточных) культур. Метод проточных культур наиболее эффективен в вопросах управляемой культуры микроводорослей, также этот метод незаменим для сравнительных оценок, например, в изучении изменений биохимического состава микроводорослей при изменении какого-либо влияющего фактора, исследований скоростей синтеза/деструкции каких-либо компонентов, входящих в состав биомассы микроводорослей, определения производительности системы для культивирования и пр.

Наиболее важным является то, что в пределе квазинепрерывная культура достигает стационарного динамического состояния, при котором устанавливается равенство всех удельных скоростей, что в значительной мере упрощает те-

оретические исследования ростовых и биохимических показателей конкретного вида водорослей.

Терминология

Способ выращивания микроводорослей называется непрерывным (квазинепрерывным), если соблюдаются следующие условия: 1) рабочий объём культуры растущих микроводорослей освещается, перемешивается и остаётся неизменным; 2) к рабочему объёму культуры с определённой скоростью добавляется питательная среда; 3) из рабочего объёма культуры с той же скоростью отбирается часть суспензии.

Теоретическое введение

Установить абсолютно непрерывный проток среды на практике при выполнении вышеперечисленных трёх условий (абсолютно непрерывная культура) — достаточно сложная задача, поэтому чаще используют квазинепрерывный («как бы непрерывный») способ выращивания микроводорослей. Суть этого метода состоит в том, что обмен части рабочего объёма культуры на питательную среду производят не непрерывно, а дискретно. При этом есть два управляющих фактора: объём слива/долива (обмен) и интервал времени между процедурой обмена. Варьируя эти две величины можно управлять скоростью протока и поддерживать плотность культуры на заданном уровне.

Существенную роль в динамике плотности квазинепрерывной культуры играет величина относительного разбавления культуры. Эта величина есть коэффициент разбавления:

$$\theta = \frac{\overline{B}_k}{\underline{B}_k}, \quad (10)$$

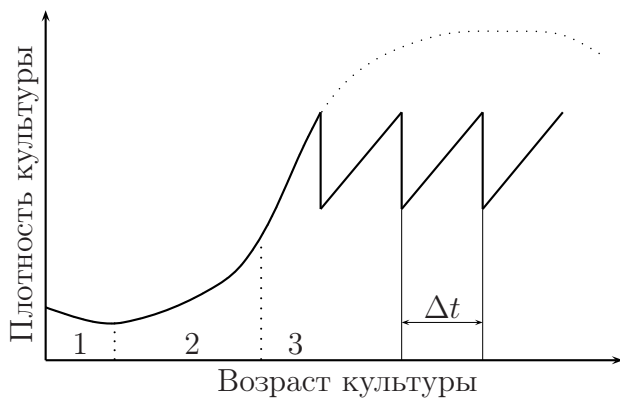


Рис. 6. Динамика плотности квазинепрерывной культуры микроводорослей. Пунктирная линия изображает накопительную кривую роста, сплошной линией изображена динамика плотности культуры при обмене (слив суспензии/долив питательной среды).

где \bar{B}_k — плотность культуры до разбавления; B_k — плотность культуры после разбавления; k — порядковый номер разбавления.

Коэффициент разбавления показывает, во сколько раз разбавлена культура, и может изменяться от 1 (разбавления нет) до бесконечности (культура после разбавления имеет нулевую плотность). Варьируя величину коэффициента разбавления можно уменьшить плотность культуры до заданного уровня. Для разбавления культуры до заданной плотности необходимо от общего объёма суспензии W микродорослей в культиваторе слить часть культуры объёмом w и долить такой же объём питательной среды, т. е. коэффициент разбавления можно выразить через объём культиватора и объём слива:

$$\theta = \frac{W}{W - w}. \quad (11)$$

Запишем выражение для объёма слива (и долива):

$$w = W - \frac{W}{\theta} = W \cdot \left(1 - \frac{1}{\theta}\right) = W \cdot \left(\frac{\theta - 1}{\theta}\right). \quad (12)$$

Выражение для удельной скорости протока питательной среды через рабочий объём культиватора имеет вид:

$$\omega = \frac{w}{W \cdot \Delta t} = \frac{\theta - 1}{\theta \cdot \Delta t} = \frac{1}{\Delta t} - \frac{1}{\theta \cdot \Delta t}, \quad (13)$$

где Δt — период времени между разбавлениями.

Ясно, что при уменьшении интервала между разбавлениями, а также уменьшение объёма слива/долива таким образом, чтобы величина удельной скорости оставалась неизменной, квазинепрерывная культура будет приближаться к абсолютно непрерывной. Типичная картина динамики роста квазинепрерывной культуры представлена на рисунке 6.

5. Методика измерения оптической плотности суспензии спирулины на длине волны света 750 нм

Η μέθοδος μέτρησης οπτικής πυκνότητας

Область применения.

Методка описывает процедуру измерения ослабления светового потока суспензией нативной культуры низших фототрофов (например, микроводорослей) на длине световой волны 750 нм в единицах оптической плотности. Процедура основана на методах, используемых при изучении оптических характеристик растений [1], в частности, суспензий микроводорослей [7].

Терминология.

Суспензия нативной культуры низших фототрофов — это совокупность клеток низших фототрофов, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой питательной (культуральной) среде.

Оптическая плотность суспензии низших фототрофов на длине волны 750 нм, D_{750} — это десятичный логарифм коэффициента пропускания T суспензии на длине волны 750 нм, взятый со знаком «минус».

Замечание. Термин «оптическая плотность» используется в биотехнологической практике в несколько ином смысле, нежели его определяет закон Бугера—Ламберта—Бера [3]. Несмотря на указанное обстоятельство, описанная процедура широко используется в практике лабораторного культивирования микроводорослей как экспресс-метод определения концентрации клеток [8], измерения ростовых характе-

ристик микроводорослей [4] и пр.

Сущность метода.

Суспензию нативной культуры низших фототрофов помещают в кварцевую измерительную кювету концентрационного фотоэлектроколориметра и измеряют величину пропускания относительно кюветы с непоглощающим раствором — питательной (культуральной) средой или дистиллированной водой.

Теоретическое введение.

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

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

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_λ — показатель поглощения света веществом (см^{-1}). Значение k_λ 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_λ) и концентрацией этого вещества в растворе (c):

$$k_\lambda = \varkappa_\lambda \cdot c.$$

Объединяя законы Бугера—Ламберта и закон Бера, получим обобщённый закон Бугера—Ламберта—Бера:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varkappa_\lambda \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot e^{-D_\tau}.$$

Здесь κ_λ — постоянная, зависящая от свойств растворенного вещества и длины волны света; c — концентрация растворенного вещества; l — толщина поглощающего слоя. Размерность величины κ_λ зависит от выбора единиц измерения концентрации c . Например, если c измеряется в г/л, то величина κ_λ имеет размерность л/(г · см). Безразмерная величина D_T называется *оптической толщиной (толщью)* и выражается в единицах оптической толщи (ед. оп. 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:

$$D_T = -\ln T$$

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

$$I = I_0 \cdot 10^{-D}; \quad D = -\lg T,$$

где D — оптическая плотность, ед. оп. плотн. Оптическая плотность и оптическая толщина связаны между собой соотношением

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

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

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

где d_λ — 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:

$$I = I_0 \cdot 10^{-(k_\lambda + d_\lambda)l} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda l},$$

где k_λ — показатель поглощения; d_λ — показатель рассеяния; $\varepsilon_\lambda = k_\lambda + d_\lambda$ — показатель ослабления (экстинкции).

В клетках низших фототрофов 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 суспензии нативной культуры микроводорослей на длине волны 750 нм, T_{750} .

Реактивы

1. Вода дистиллированная;
2. $NaCl$ (поваренная соль).

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 фотореакторе тщательно перемешивают и отбирают аликвоту в пробирку. Объём аликвоты должен составлять не менее 10 мл.

Подготовка пробы. Непосредственно перед измерением для плотных культур требуется подготовка пробы, которая состоит в разбавлении определенного объёма суспензии микроводорослей изотоническим раствором $NaCl$ ² с последующим пересчётом результатов измерений. Для этой цели

² $NaCl$ используется в качестве универсального регулятора тоничности раствора. Для *Spirulina platensis* вместо $NaCl$ можно использовать прозрачный раствор питательной среды Зарука.

смешивают некоторый объём суспензии и раствора $NaCl$ в заданном соотношении. Соотношение подбирают таким образом, чтобы результат измерений коэффициента пропускания попадал в диапазон минимальной погрешности используемого прибора.

После перемешивания суспензии приступают к измерению величины пропускания. Во избежание каких-либо проявлений агглютинации клеток при разбавлении следят за тем, чтобы различие температур добавляемого раствора $NaCl$ и суспензии в пробе составляло не более $5^{\circ}C$. После измерений смесь $NaCl$ и суспензии в стакан с пробой *не* возвращают.

Подготовка изотонического раствора $NaCl$. Для приготовления изотонического раствора $NaCl$ используют мерную колбу либо другую посуду объёмом не менее 1 л. В 1 л дистиллированной воды растворяют навеску $NaCl$, которая по массе равна суммарной массе минеральных солей, растворённых в питательной среде. Раствор считается готовым после полного растворения $NaCl$. Свежеприготовленный раствор подлежит хранению в закрытой посуде не более 7–10 дней при $20^{\circ}C$.

Измерение доли пропускания суспензии микродорослей. 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 измирительную кювету. Здесь важно, чтобы между измерением и перемешиванием время оставалось минимальным — это уменьшает ошибки измерений связанные с оседанием культуры на дно кюветы. При измерении следят за тем, чтобы положение кюветы оставалось неизменным (расстояние от края кюветы до шторки, закрывающей фотоэлемент, должно составлять 6,2 см).

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

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

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

Контроль качества и возможные недостатки метода

Следует помнить, при использовании концентрационного фотокolorиметра КФК-2 описанная процедура даёт весьма приблизительный результат поглощения монохроматического светового пучка клетками микроводорослей [3], поэтому к результатам измерений следует относиться с осторожностью. Также следует отметить, что аглютинация клеток приводит к заведомо неверному результату измерений.

6. Методика измерения спектра ослабления суспензии нативной культуры *Spirulina platensis* в области ФАР

Η μέθοδος μέτρησης φάσματος καλλιέργειας

Область применения

Методка описывает процедуру измерения спектра ослабления светового потока суспензией нативной культуры *Spirulina platensis* в единицах оптической плотности в области фотосинтетически активной радиации (ФАР). Процедура основана на методах, используемых при изучении оптических характеристик растений [1], в частности, суспензий микроводорослей [7].

Терминология

Суспензия нативной культуры Spirulina platensis — это совокупность клеток *Spirulina platensis*, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой питательной (культуральной) среде.

Спектр ослабления суспензии Spirulina platensis — это зависимость величины ослабления светового потока суспензией низших фототрофов, выраженной в единицах оптической плотности, от длины световой волны.

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 *Spirulina platensis* помещают в кварцевую измерительную кювету спектрофотометра и измеряют величину ослабления (пропускания) относительно кюветы с непоглощающим раствором — питательной (культуральной) средой или дистиллированной водой.

Теоретическое введение

Теоретические представления о законе Бугера-Ламберт-Бера можно получить, обратившись к странице 84. В дополнение следует отметить, что в клетках низших фототрофов основная доля поглощённого света приходится на фотосинтетические пигменты. Помимо этого, свет поглощают также 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 получения именно величины поглощения суспензии клеток используют прибор со специальной приставкой — фотоинтегрирующей сферой, — направляющей рассеянные лучи на регистрирующий элемент.

Прибор

- Регистрирующий спектрофотометр СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Спектральный диапазон: 200–1100 нм. Диапа-

зон 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.

Измеряемые величины

- Спектральные коэффициенты направленного пропускания суспензии низших фототрофов в диапазоне 400–800 нм с шагом 0,1 нм.

Реактивы

1. Вода дистиллированная;
2. $NaCl$ (поваренная соль).

Измерения

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 10 мл.

Подготовка пробы. Непосредственно перед измерением для плотных культур требуется подготовка пробы, которая состоит в разбавлении определенного объема суспензии микроводорослей изотоническим раствором $NaCl$ ³. Для этой цели смешивают некоторый объем суспензии и раствора $NaCl$ в заданном соотношении. Соотношение подбирают таким образом, чтобы результат измерений попадал в диапазон допустимых значений, определяемых характеристиками прибора, например, для СФ-2000 диапазон допустимых значений спектрального коэффициента направленного пропускания составляет 1–100%, что соответствует 2–0 единицам оптической плотности.

После перемешивания суспензии приступают к измерениям. Во избежание каких-либо проявлений агглютинации клеток при разбавлении следят за тем, чтобы различие температур добавляемого раствора $NaCl$ и суспензии в пробе составляло не более 5°C. После измерений смесь $NaCl$ и суспензии в стакан с пробой *не* возвращают.

Подготовка изотонического раствора $NaCl$. Подробное описание приведено на странице 88.

Измерение спектра ослабления суспензии. В кювету заливают пробу и проводят измерение спектра ослабления суспензии *Spirulina platensis* в области от 400 до 750 нм. В кювету сравнения заливают дистиллированную воду. Пример спектра *Spirulina platensis* представлен на рисунке 7.

³ $NaCl$ используется в качестве универсального регулятора тоничности раствора.

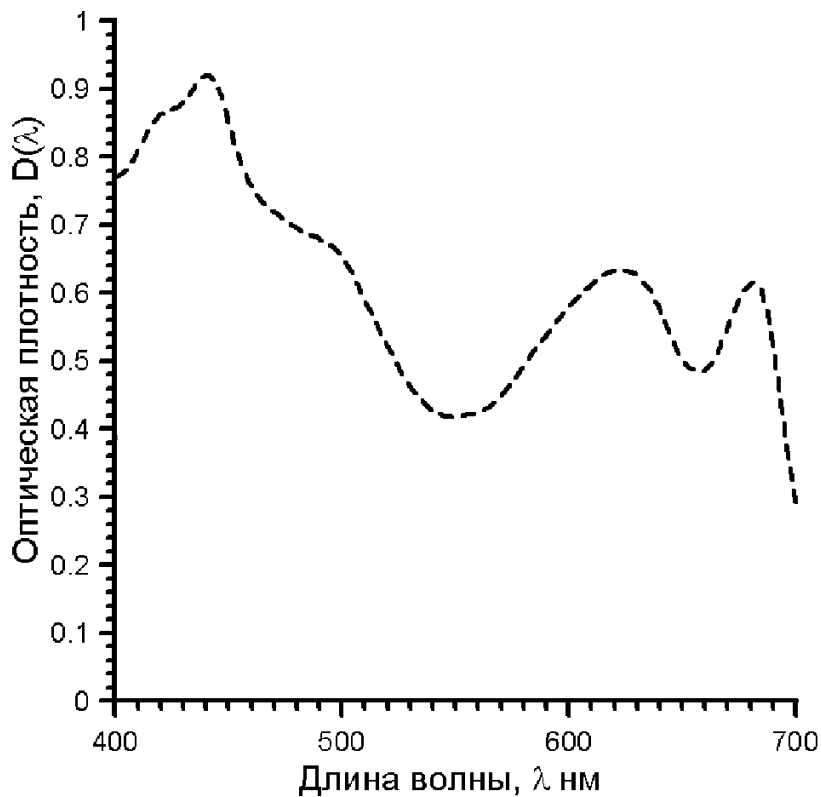


Рис. 7. Спектр культуры *Spirulina platensis*.

7. Методика отделения биомассы спирулины от культуральной жидкости

Область применения

Процедура описывает метод, который позволяет оценить плотность, т. е. концентрацию клеток спирулины в культуре, выраженную в граммах на литр. Своё начало данный метод берёт от методов планктологии сбора фитопланктона [5]. Описанный метод нашёл своё применение и в области искусственного интенсивного культивирования микроводорослей. Особенно актуален в работе с филаментными сине-зелёными видами (культурами) водорослей в лаборатории и в условиях промышленного производства биомассы микроводорослей. Метод прост в использовании, не требует больших капиталовложений и специального оборудования.

Терминология

Биомасса (от био. . . и лат. *massa* — ком, кусок) — выраженное в единицах массы количества живого вещества, приходящееся на единицу площади или объёма местообитания ($\text{г}/\text{м}^2$ или $\text{г}/\text{л}$).

Принцип анализа

Принцип метода заключается в том, что суспензию филаментных микроводорослей заливают в воронку с бумажным фильтром или на сито, с ячейей меньшей длины трихома (нити). С течением времени культуральная жидкость про-

ходит сквозь фильтр/сито (процесс фильтрации), при этом на фильтре/сите, происходит сгущение клеток микроводорослей.

Оборудование и материалы

- Стакан ёмкостью не менее 1 л;
- Штатив обыкновенный для крепления воронки;
- Воронка для фильтрования с ребристой внутренней поверхностью, поддерживающей фильтр;
- Бумажный фильтр или планктонное сито (мельничный газ) №95 (размер ячеек 0,1 мм).

Реактивы

Вода дистиллированная.

Подготовительные процедуры

Фильтр. Квадратный листок фильтровальной бумаги нужного размера (в зависимости от величины плотности культуры и размера воронки) складывают вначале пополам (сгибая по вертикали), а затем вчетверо (сгибая по горизонтали), затем ножницами обрезают полукругом верхний край полученной воронки. Для получения складчатого фильтра (плотный фильтр) многократно сгибают фильтр таким образом, чтобы линия сгиба проходила через угол (дно) бумажной воронки. Чем меньше расстояние между линиями сгиба, тем больше складок, тем качественней складчатый фильтр.

При использовании планктонной ткани (мельничного газа) в качестве фильтра поступают аналогичным образом.

Воронку укрепляют в кольце, присоединённом к штативу. В неё кладут изготовленный фильтр, который перед тем как приступить к фильтрации суспензии предварительно слегка смачивают. Весьма часто для ускорения фильтрации удлиняют стеклянную трубку воронки, что может быть сделано при помощи резиновой трубки.

Для того чтобы трубка быстро наполнялась культуральной жидкостью, внутренний диаметр не должен превышать 3 мм. Образовавшийся столбик жидкости, спускаясь, действует как насос и тем самым ускоряет фильтрование. Очень полезно, чтобы трубка воронки имела петлю, облегчающую заполнение трубки культуральной жидкостью. Такой удлинённый конец с петлёй может быть приспособлен и к воронке с коротким концом при помощи резиновой трубки, снабжённой зажимом.

Процедуры

Суспензию микроводорослей заливают в воронку с фильтром не сразу после извлечения из культиватора, а спустя некоторое время (10–15 мин). Это время необходимо для оценки скорости агглютинации клеток. Чем больше будет проявление агглютинации, тем проще будет процесс фильтрации. При необходимости время можно увеличить до 30 мин.

Замечание. Следует иметь в виду: чем выше температура суспензии, тем меньший промежуток времени в распоряжении, поскольку при высоких температурах разрушение клеток приводит к выходу их содержимого (органики) в среду, что в значительной степени затруднит процесс фильтрации.

С помощью зажима на конце трубки воронки регулируют скорость фильтрации, следя за тем, чтобы в трубку воронки не попадали воздушные пузыри и не образовывались

воздушные пробки. По мере необходимости в воронку аккуратно добавляется суспензия микроводорослей.

По окончании процесса фильтрации сгущенную биомассу при необходимости отмывают от остатков солей, приливая малыми порциями дистиллированную воду⁴. При этом объем дистиллированной воды не должен превышать 1,5-2-х объемов сгущенной биомассы, в противном случае возможны потери биомассы из-за разрушения клеток.

После высушивания биомассы на фильтре по разнице весов до и после фильтрации можно судить о плотности в отфильтрованном объеме суспензии.

Контроль качества и возможные недостатки метода.

Контролем качества отмывки сгущенной биомассы от солей может служить величина рН воды прошедшей сквозь фильтр со сгущенной биомассой. Величина рН стекающей воды должна составлять 7–7,5 ед. При необходимости объем воды для отмывки от солей можно увеличить.

⁴При последующем высушивании биомассы при температуре более 40°C вместо дистиллированной воды используют изотонический раствор $(NH_4)_2CO_3$ [3].

Βιβλιογραφία

1. Брант А. Б., Тагеева С. В. Оптические параметры растительных организмов. — М.: Наука, 1967. — 302 с. — (Στα ρωσικά)
2. Брянцева Ю. В., Дробецкая И. В., Харчук И. А. Характеристики цианобактерии *Spirulina (Arthrospira) platensis* // Экология моря. — 2005. — Вып. 70. — С. 24–27. — (Στα ρωσικά)
3. Геворгиз Р. Г., Алисиевич А. В., Шматок М. Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры // Экология моря. — 2005. Вып. 70. — С. 96–106. — (Στα ρωσικά)
4. Геворгиз Р. Г., Лелеков А. С. Применение простейших моделей для описания накопительных кривых // Экология моря. — 2005. — Вып. 67. — С. 38–43. — (Στα ρωσικά)
5. Киселёв И. А. Планктон морей и континентальных водоёмов. — Л.: Наука, 1969. — Т. 1. — 658 с.
6. Кондратьева Н. В. Флора водорослей континентальных водоемов Украины. Прокариотические водоросли (Procauyorhycobionta). — Киев, 2001. — Вып. 1. Общая характеристика. — Ч. 2. Экология, значение, вопросы систематики. — 342 с. — (Στα ρωσικά)

7. 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. — 38–42. — (Στα ρωσικά)
8. Сиренко Л. А. Методы количественного учета роста водорослей в культуре и водоеме / Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — К.: Нук. думка, 1975. — С. 30–50. — (Στα ρωσικά)
9. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. Периодическая культура // Экология моря. — 2006. — Вып. 67. — С. 98–104. — (Στα ρωσικά)
10. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. 2. Квазинепрерывная культура // Экология моря. — 2005. — Вып. 67. — С. 98–110. — (Στα ρωσικά)
11. Richmond A. Microalgae of economic potential: Handbook of microalgal mass culture / Ed. Richmond A. — Boca Raton; CRC Press, 1986. — P. 199–244.
12. Tomasseli L. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* / Ed. Vonshak A. — London; Taylor; Francis, 1997. — P. 1–15.
13. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Stech. Et Gardner) Geitler // Ph. D. thesis. — Paris, 1966. — 138 p.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Εισαγωγή | 5 |
| 1. Ταυτότητα του στελέχους | 6 |
| 2. Σύνθεση του διαλύματος Ζαρρουκ | 9 |
| 3. Μέθοδος συσσωρευτικών καλλιέργειών | 17 |
| 4. Αναλογική μέθοδος συνεχούς καλλιέργειας | 32 |
| 5. Η μέθοδος μέτρησης οπτικής πυκνότητας | 36 |
| 6. Η μέθοδος μέτρησης φάσματος καλλιέργειας | 44 |
| 7. Μέθοδος φιλτραρίσματος της βιομάζας της Σπιρυλίνα | 49 |
| Введение | 53 |
| 1. Паспорт штамма <i>Spirulina platensis</i> | 54 |
| 2. Приготовление питательной среды Заррук | 57 |
| 3. Метод накопительных культур | 64 |
| 4. Квазинепрерывная культура | 79 |
| 5. Методика измерения оптической плотности | 83 |
| 6. Методика измерения спектра ослабления | 90 |
| 7. Методика фильтрации биомассы спирулины | 95 |
| Βιβλιογραφία | 99 |

Ρούντολφ Πάβλοβιτς Τρενκενσού,

Διευθυντής Τμήματος Βιοτεχνολογιών και φυτικών πόρων.
Ινστιτούτο Βιολογίας Νότιων Θαλασσών Α.Ο. Κοβαλέβσκι
Λεωφόρος Ναχίμοβα, 2, Σεβαστούπολη, Κριμαία

E-mail: trenkens@yandex.ru <http://biotex.ibss.org.ua>

Τηλέφωνο: (+038)(0692)55-07-95

Γκεβοργκίτς Ρουσλάν Γκεόργκιεβιτς,

Επιστημονικός συνεργάτης του Τμήματος
Βιοτεχνολογιών και φυτικών πόρων.

<http://biotex.ibss.org.ua/persons/96/>

Εμμανουήλ Γεωργίου Λιανάκης,

Αγρονόμος Τοπογράφος Μηχανικός, Αθηνά

Τηλέφωνο: +30 210 86 46 515 +30 210 86 79 524

E-mail: lian-ath@otenet.gr

Χρυσάνθη Αναστασίου Οικονόμου,

Πλαστικός Χειρουργός, Αθηνά

E-mail: chrisaikonomou@hotmail.com

Παραδόθηκε για εκτύπωση 16.02.09. Εγκρίθηκε για εκτύπωση 17.02.09

Οφσετ. Φορμάτ 70×108 ¹/₁₆. Τύπος Τιμεσ-Ρομαν Όγκος τυπωμένων
φύλλων _____. Εκδόσεις _____. Αρ. εντύπων _____. Παραγγελιά _____.
