

Количественные закономерности роста накопительной культуры *Arthrospira platensis*

Лелеков А.С.^{1*}, Чернышев Д.Н.², Клочкова В.С.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени
А.О. Ковалевского РАН", Севастополь, Россия

²Севастопольский государственный университет, кафедра "Физика", Севастополь,
Россия

Аннотация. Работа посвящена моделированию светозависимого роста культуры *Arthrospira platensis*. В ходе экспериментального исследования получена накопительная кривая, характеризующаяся наличием продолжительной линейной фазы. Показано, что постоянство продуктивности культуры определяется световыми условиями, в которых находятся клетки. Предложена простейшая модель светозависимого роста накопительной культуры, предполагающая, что удельная скорость определяется поверхностной облучённостью, коэффициентом поглощения света и концентрацией хлорофилла *a*. Верификация модели на полученных экспериментальных данных свидетельствует о том, что постоянство продуктивности наблюдается только в случае гиперболического уменьшения содержания хлорофилла *a* и других структурных компонентов биомассы. Предложен метод экспресс-оценки концентрации фотосинтетических пигментов культуры *A. platensis* по спектру её поглощения при помощи суммы кривых Гаусса. Проведена математическая декомпозиция спектра поглощения *A. platensis*, рассчитаны все параметры гауссиан. Для красной области спектра представлено простое выражение, позволяющее оценить концентрацию хлорофилла *a* и фикобилипротеинов. Рассчитан нативный коэффициент экстинкции хлорофилла *a* при 678 нм, который составил $65 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Предложен алгоритм определения концентрации фотосинтетических пигментов непосредственно по истинному спектру поглощения культуры *A. platensis*, не вмешиваясь в процессы её роста.

Ключевые слова: интенсивность света, удельная скорость роста, продуктивность, спектр поглощения, моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Культуры низших фотоавтотрофных микроорганизмов применяются в качестве модельных объектов в биофизике, гидробиологии, экологии и др. науках. В современной систематике к категории низших фотоавтотрофов относят одноклеточные водоросли и цианопрокариоты, которые способны к оксигенному фотосинтезу, характеризуются разделением фотохимических и ферментативных процессов [1, 2]. Основным достоинством использования культур микроводорослей является возможность получения воспроизводимых результатов. Это позволяет с заданной точностью дать количественную оценку влияния того или иного фактора среды на скорость фотобиосинтеза. Одним из наиболее распространенных модельных объектов является спирулина *Arthrospira (Spirulina) platensis* – многоклеточная нитевидная цианобактерия. На сегодняшний день детально исследованы механизмы синтеза

* a.lelekov@yandex.ru

биологически активных соединений спирулины, её пигментный состав [3]. Показано, что она является высокопродуктивным источником белков, витаминов, минералов, углеводов и фикобилипротеиновых пигментов [4].

В зависимости от поставленных целей и задач исследования роста культур микроводорослей проводятся в различных условиях, как по уровню освещённости, так и по составу питательных сред. При использовании концентрированных питательных сред [5–7] оптическая плотность культуры может достигать нескольких единиц, при этом число клеток превышает 10^8 кл.·мл⁻¹. Световые условия, в которых находятся клетки, оказывают влияние на собственно фотосинтез [8], хроматическую адаптацию клеток [9], скорость ассимиляции основных биогенных элементов питательной среды [10–12], направленность клеточного биосинтеза [13] и многие другие физиологические отклики [14, 15]. Для выяснения количественных закономерностей влияния света на скорость и эффективность фотобиосинтеза для культур микроводорослей разработаны различные теоретические подходы [16–20]. На сегодняшний день остаются нерешёнными вопросы количественного влияния света на скорость роста оптически плотных культур микроводорослей и продукцию основных биохимических составляющих.

Независимо от базовых предположений и гипотез, на которых строится моделирование роста культуры, конечным критерием адекватности математической модели традиционно является её соответствие реальным экспериментальным данным. Однако, определение содержания основных биохимических компонентов биомассы микроводорослей методически сложная задача, как на практике, так и в теории [21]. Поэтому на сегодняшний день актуальна разработка экспресс-методов определения содержания белков, углеводов, липидов, пигментов в клетках микроводорослей. С этой точки зрения интерес представляет нативный спектр поглощения культуры, который несёт в себе информацию о пигментном составе клеток водорослей. Конечно, для получения такой информации необходима математическая обработка спектров. Оптическая плотность культуры – аддитивная величина, поэтому общий спектр поглощения представляет собой сумму спектров отдельных пигментов. Спектры пигментов состоят из нескольких максимумов, форма и положение которых определяется хромофорными группами. Поглощение хромофорной группы, относительно максимума, распределено симметрично. Это свойство позволяет описать спектр пигмента одной или несколькими кривыми Гаусса [22, 23].

Спектрофотометрические исследования поглощения света культурой микроводорослей осложняются значительным вкладом рассеяния, возникающего из-за того, что размеры клеток в суспензиях значительно больше, чем длина волны видимого света, а также неоднородным распределением пигментов в клетке. Снижение интенсивности светового потока происходит не только при поглощении света, но и в результате светорассеяния. Вследствие многократного отражения и рассеяния в образце (особенно в оптически плотных культурах) световой пучок отклоняется от своего первоначального направления. В результате при измерениях на фотоприёмник попадает не весь прошедший через объект свет, а измеряемая оптическая плотность, в соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера, повышается. Простые прямые однолучевые и двухлучевые спектрофотометры, являясь стандартным лабораторным оборудованием, не дают достоверных измерений спектральных свойств культуры клеток из-за эффектов рассеяния света. Кроме того, фактическое количество рассеянного света очень сильно зависит от геометрии кюветы для образца и детектора в этом конкретном спектрофотометре и, следовательно, является приборным параметром. Термин "оптическая плотность" часто используется вместо коэффициента поглощения, потому что измеренная оптическая плотность на данной длине волны будет представлять собой комбинацию рассеяния света клетками (турбидиметрия) и поглощения пигментами в клетках [24].

Один из способов устранения потерь рассеянного света – использование в спектрофотометрах интегрирующей сферы (ИС). Образец помещается внутри такой сферы, внутренняя поверхность которой имеет высокий (близкий к 1) коэффициент отражения света. Благодаря этому, весь рассеянный суспензией водорослей свет попадает на фотодетектор, поэтому измеряемая оптическая плотность обусловлена только истинным поглощением образца. Помимо инструментальных способов учёта светорассеяния используют поправочные коэффициенты. При регистрации спектров поглощения микроводорослей на разном расстоянии от интегрирующей сферы [25], возможно изменять вклад светорассеяния: чем ближе образец к интегрирующей сфере, тем больше рассеянного света попадает на фотодетектор и оптическая плотность образца становится меньше. Измерив спектры поглощения образца вблизи и вдали от интегрирующей сферы, вычисляется истинный спектр поглощения и рассеяния света [26].

Биомасса микроводорослей создаёт градиент освещённости внутри фотобиореактора. Количество поглощённой культурой световой энергии определяется интенсивностью света на поверхности культиватора, толщиной рабочего слоя, плотностью культуры, скоростью перемешивания клеток и др. [27]. При моделировании влияния света на продуктивность культуры обычно используют понятие средней пространственной облучённости, которая, согласно [28], может быть записана в виде:

$$I = I_0 \frac{(1 - 10^{-K_{уд} \cdot \pi})}{2,3 \cdot K_{уд} \cdot \pi},$$

где I_0 – поверхностная освещённость; $K_{уд}$ – удельный показатель поглощения хлорофилла a , $\text{м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$; π – поверхностная концентрация хлорофилла a , $\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$.

Выражение в скобках представляет собой интегральный (по всему диапазону фотосинтетически активной радиации (ФАР)) коэффициент поглощения света. Известно, что вся поглощённая энергия передаётся на реакционные центры фотосинтеза, являющимися молекулами хлорофилл a . Хлорофилл a также входит в структуру светособирающего комплекса (ССК): у *A. platensis* на одну молекулу реакционного центра P700 приходится 100 – 200 молекул антенного хлорофилл a [29]. Знание количественной зависимости коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла a позволит прогнозировать величину продуктивности культуры, а также продукции биохимических компонентов биомассы.

Цель работы – на основе известных теоретических представлений о фотобиосинтезе разработать алгоритм описания роста накопительной культуры *A. platensis* в условиях светолIMITИРОВАНИЯ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе ФИЦ Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь и кафедры физики Севастопольского государственного университета. В качестве объекта исследования использовали культуру цианопрокариоты *Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont из коллекции ФИЦ ИнБЮМ. Культуру выращивали в унифицированной лабораторной установке [30] на питательной среде [5] в накопительном режиме. Использовался фотобиореактор плоскопараллельного типа толщиной 2 см, площадь рабочей поверхности $0,05 \text{ м}^2$, объём 1 л. В качестве источника освещения применяли холодные люминесцентные лампы Philips Daylight мощностью 18 Вт. Освещённость регистрировали люксметром Ю-116, средняя освещённость рабочей поверхности фотобиореактора составляла 5 клк, что с учётом спектра лампы составляет около $16 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ [31]. Температура суспензии поддерживалась на уровне $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Барботаж

культуры осуществляли аквариумным компрессором, скорость подачи воздуха составляла $0.5 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1}$ в минуту с дополнительной подачей углекислоты для стабилизации рН в диапазоне 9–9.5 единиц.

Спектры поглощения регистрировались в 1 см кюветах в диапазоне от 400 до 800 нм с шагом 0.5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO_4).

Для определения сухого веса (СВ) величину оптической плотности D_{750} , измеренную на фотометре КФК-2 в 0.5 см кюветах, умножали на эмпирический коэффициент $k = 0.8 \text{ г} \cdot \text{СВ} \text{ л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику для уменьшения влияния светорассеяния на показания прибора.

Концентрацию хлорофилла a определяли по стандартной методике [32]: биомассу спирулины высушивали в течение 24 часов при 60°C , экстракцию производили 100 %-ым ацетоном, спектры экстрактов промеряли на спектрофотометре СФ-2000.

Аппроксимацию экспериментальных данных и расчёт коэффициентов моделей выполняли в программах Grapher, SciDavis, QtiPlot, разделение спектра на отдельные кривые Гаусса в программе MagicPlot.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке 1,А представлена накопительная кривая роста культуры *A. platensis*, которая характеризуется наличием ярко выраженных экспоненциальной и линейной фаз роста. Биомасса культуры за две недели эксперимента увеличилась почти в 125 раз и достигла $3 \text{ г} \cdot \text{СВ} \text{ л}^{-1}$, что с учётом толщины фотобиореактора (2 см) составляет $60 \text{ г} \text{ СВ} \text{ м}^{-2}$. Экспоненциальная фаза роста продолжалась первые 3 суток, при этом рост культуры описывался выражением:

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

где B_0 – начальная плотность культуры, μ_m – максимальная удельная скорость роста.

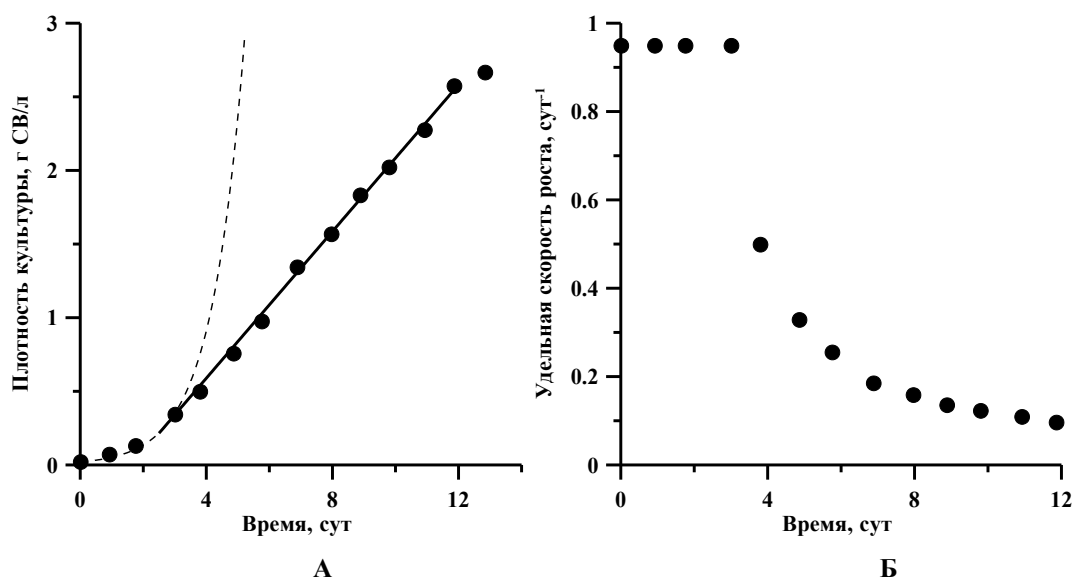


Рис. 1. А – накопительная кривая роста культуры *A. platensis*. Пунктирная линия – аппроксимация экспоненциальной фазы роста выражением (1). Сплошная линия – аппроксимация линейной фазы роста выражением (2). Б – изменение удельной скорости роста в эксперименте.

По окончании экспоненциальной фазы роста наступала продолжительная (с третьих по двенадцатые сутки) линейная фаза, характеризующаяся постоянством продуктивности культуры:

$$B = B_l + P_m(t - t_l), \quad (2)$$

где B_l – плотность культуры момент начала линейного роста t_l , P_m – максимальная продуктивность.

Значения кинетических параметров культуры μ_m и P_m составили 1 сут^{-1} и $0.25 \text{ г СВ л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ($5 \text{ г СВ м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$) соответственно. На 12 сутки эксперимента произошло снижение скорости роста культуры, что обусловлено сменой лимитирующего фактора. Следует отметить, что среда Заррук по основным биогенным элементам (азот, фосфор и др.) рассчитана на $4\text{--}4.5 \text{ г СВ л}^{-1}$. Это означает, что при плотности культуры свыше 3 г СВ л^{-1} вероятно наличие лимитирования одним из биогенных элементов среды. Таким образом, можно утверждать, что по окончании экспоненциальной фазы с третьих по двенадцатые сутки наблюдался линейный рост биомассы *A. platensis*, который обусловлен световым лимитированием. Ранее [33], для оптически плотных культур микроводорослей, нами было высказано предположение, что линейная фаза обусловлена снижением средней пространственной облучённости. Световые условия по-разному воздействуют на скорости синтеза тех или иных биохимических составляющих клеток, приводя в итоге к постоянству продуктивности и уменьшению удельной скорости роста (см. рис. 1,Б). Однако вопрос, какие именно качественные и количественные изменения в биохимическом составе биомассы обуславливают линейный рост, остаётся открытым.

Рассмотрим оптически плотную культуру микроводорослей, находящуюся в плоскопараллельном фотобиореакторе при постоянном освещении. В таких условиях при избытке минеральных биогенов скорость роста культуры в простейшем случае будет определяться приведённой плотностью потока энергетического субстрата λ_i :

$$P_{\text{norm}} = \mu_{\text{norm}} = \lambda_i, \quad (3)$$

$$\lambda_i = \frac{\varphi_e \cdot I}{\mu_e \cdot F_0}, \quad (4)$$

где P_{norm} , μ_{norm} – нормированная скорость и удельная скорость синтеза биомассы (безразмерные величины); I – плотность потока фотосинтетически активной радиации (ФАР), поглощаемой культурой, $\text{Дж} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; φ_e – количество макроэргов, восстанавливаемых за счёт единицы энергии ФАР, $\text{мг} \cdot \text{Дж}^{-1}$; μ_e – активность ключевого комплекса, регулирующего энергообмен в клетке, с^{-1} ; F_0 – поверхностная концентрация ключевого регулятора энергообмена, $\text{мг} \cdot \text{м}^{-2}$.

В контексте данной работы величина F_0 есть некоторый мультиферментный комплекс (лимитирующее звено), ограничивающий скорость образования первичных углеводов или переноса зарядов. Исходя из предположения о пропорциональности всех структурных компонентов биомассы [19], концентрацию F_0 можно линейно связать с хлорофиллом a . Последнее предположение подтверждается экспериментально: для многих видов микроводорослей обнаруживается прямая пропорциональная зависимость между белком и хлорофиллом a [34, 35].

Таким образом, из (4) следует, что удельная скорость синтеза биомассы обратно пропорциональна концентрации хлорофилла a :

$$\mu_{\text{norm}} = \frac{\varphi_e \cdot \alpha \cdot I_0}{\mu_e \cdot f \cdot \pi}, \quad (5)$$

где α – коэффициент поглощения света, I_0 – облучённость поверхности фотобиореактора, $\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$, f – коэффициент пропорциональности между F_0 и π , π – концентрация хлорофилла a , $\text{мг} \cdot \text{м}^{-2}$.

Выражение (5) показывает, что удельная скорость синтеза биомассы определяется поверхностной облучённостью, коэффициентом поглощения света и концентрацией хлорофилла *a*. Остальные параметры, входящие в выражение (5) в условиях светолIMITИРОВАНИЯ можно считать постоянными [19].

В условиях накопительной культуры отбор проб для определения пигментов, белков, липидов, углеводов и др. компонентов приводит к вмешательству в процессы роста. Выходом из сложившейся ситуации может служить запись спектра поглощения культуры с последующим её возвратом в фотобиореактор. Несложная математическая обработка спектров позволяет получить большое количество информации о структурных и функциональных параметрах культуры, в том числе входящих в выражение (5), динамике их изменения. На рисунке 2,А представлены спектры поглощения культуры *A. platensis* в эксперименте.

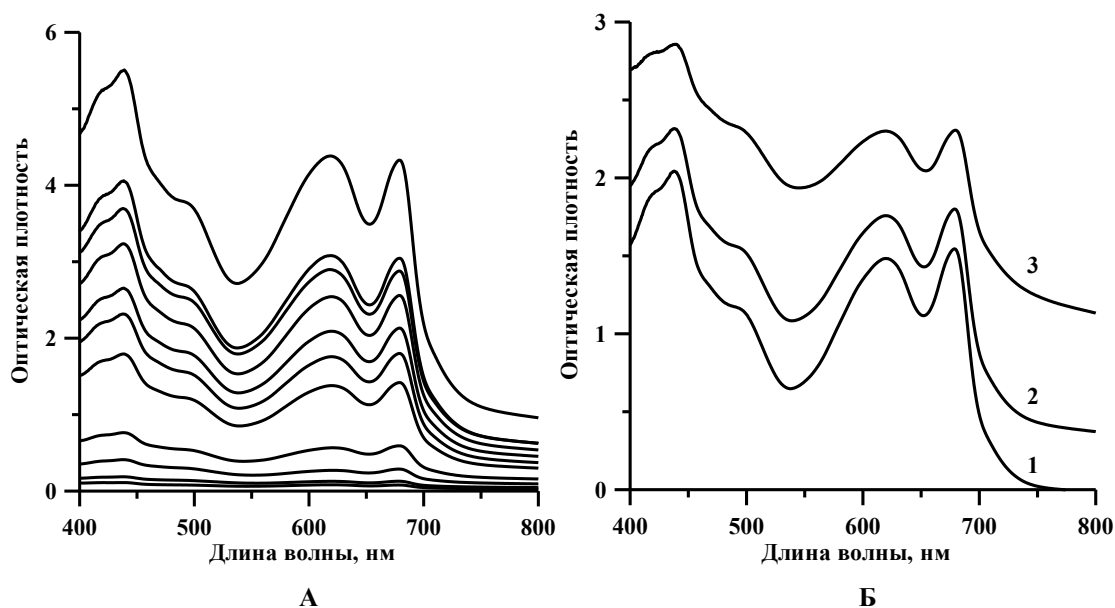


Рис. 2. А – спектры поглощения накопительной культуры *A. platensis*. Б – спектр поглощения на разных расстояниях от ИС: 1 – истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние, 2 – спектр при стандартном положении кюветы ($D(\lambda;0)$), 3 – спектр на расстоянии 1 см от ИС ($D(\lambda;r)$).

Анализ рисунка 2,А показывает, что даже при записи спектров поглощения *A. platensis* на приборах с ИС светорассеяние может давать существенный вклад в величины оптической плотности. Поэтому для решения поставленных задач первым шагом является получение истинного спектра поглощения культуры, с компенсацией рассеяния.

Истинные спектры поглощения, компенсированные на рассеяние

Конструкция используемого спектрофотометра Lambda 365 Double Beam UV-Visible предполагает установку кюветы перед интегрирующей сферой, что приводит к частичному светорассеянию и ненулевым значениям оптической плотности в дальней красной области. В литературе приводится методика корректировки полученных спектров, предполагающая запись спектра одного и того же образца на разных расстояниях от ИС [25]. В нашем случае кювету располагали вплотную к ИС и на расстоянии около 1 см. На рисунке 2,Б приведён спектр поглощения *A. platensis* при плотности культуры около $1 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$ на разных расстояниях от ИС.

Согласно [25], истинный спектр поглощения $\tilde{A}(\lambda)$, компенсированный на рассеяние, определяется по формуле:

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; r) - L_{\text{осл-е}}(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (6)$$

где $D(\lambda; r)$ – оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ – поправочный коэффициент ослабления света; $D(\lambda; 0)$ – оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы.

Значение поправочного коэффициента ослабления света $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ может быть определено в области длин волн, в которой клетки микроводорослей не поглощают, т. е. 750–800 нм:

$$L_{\text{осл-е}}(r; 0) = \frac{D_{750-800}(\lambda; r)}{D_{750-800}(\lambda; r) - D_{750-800}(\lambda; 0)}. \quad (7)$$

Результаты наших расчётов показывают, что $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ незначительно убывает, поэтому будем использовать длину волны 800 нм. Также можно использовать среднее значение L в области 750–800 нм [25]. Истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние, представлен на рисунке 2,Б (кривая 1).

Моделирование истинных спектров поглощения культуры *A. platensis* кривыми Гаусса

При анализе нормированного в точке максимума (678 нм) истинного спектра поглощения культуры *A. platensis*, для достоверного выявления пиков, была вычислена производная второго порядка. Контур второй производной похож на спектр поглощения, но его полосы имеют более тонкую организацию [36]. В производном спектре второго порядка была отмечена сложная структура, в которой прослеживались явные пики и плечи (рис. 3,А). Можно предположить, что выявленные явные максимумы связаны с определенными полосами поглощения основных пигментов сине-зеленых водорослей, а именно: хлорофилл *a*: 420, 440, 630, 680 нм, общие каротиноиды: 500 нм, и общей группой фикобилиновых пигментов: 600 нм.

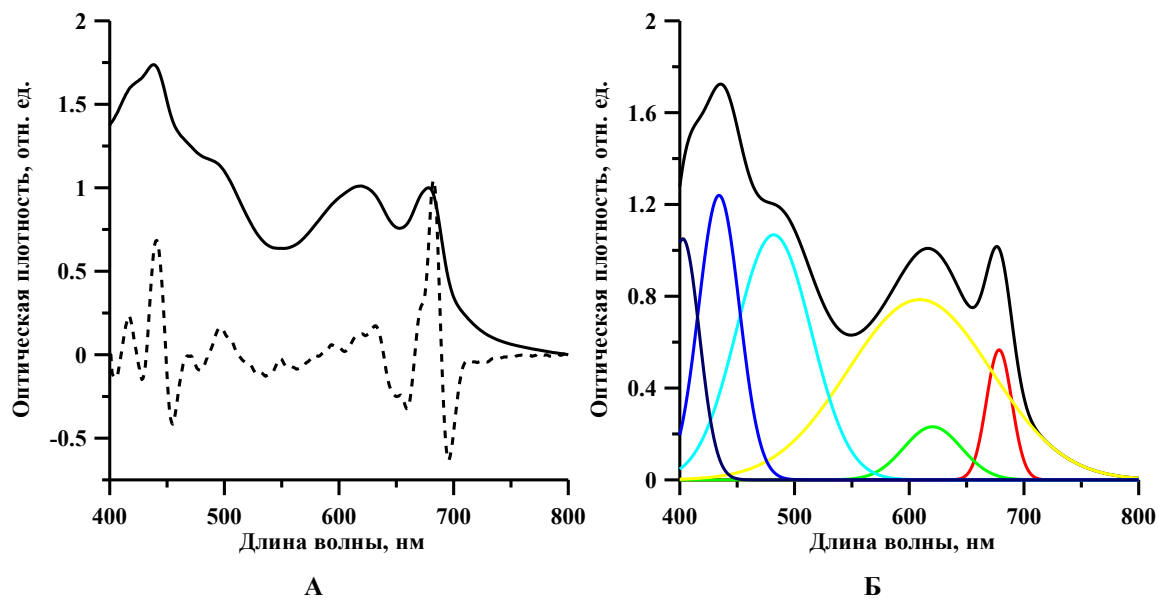


Рис. 3. А – спектр поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* нормированный по значению D_{678} (сплошная линия). Пунктирная линия – вторая производная спектра. Б – разделение истинного спектра поглощения на отдельные кривые Гаусса.

Полученные данные послужили начальными точками максимумов пиков при аппроксимации спектра кривыми Гаусса. Каждый отдельный пик был описан выражением:

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (8)$$

где: $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед; D_{\max} – амплитуда пика, отн. ед; λ_i – длина волны, нм; λ_{\max} – положение максимума пика, нм; σ – полуширина пика, нм.

Результат математического разделения спектра на отдельные кривые представлен на рисунке 3,Б. Сравнивая полученные данные с литературными источниками [37, 38], возможно, соотнести рассчитанные пики с определенными пигментами. Спектр хлорофилла *a* соответствует пикам с максимумами 402, 434, 620, и 678 нм. Суммарные каротиноиды представлены одним пиком 482 нм. Общий спектр фикобилиновых пигментов описан пиком с максимумом 609 нм. Вычисленные данные (положения максимумов, отношение амплитуд, и полуширины пиков) можно использовать как математические модели отдельных пигментов. Ниже представлена модель спектра поглощения культуры. Общий спектр культуры представляет сумму спектров хлорофилла *a*, фикобилинов, и суммарных каротиноидов. В данной модели присутствует три неизвестные величины – концентрация хлорофилла *a*, фикобилиновых пигментов и общих каротиноидов.

$$D(\lambda) = D_{\text{Хла}}(\lambda) + D_{\text{Фико}}(\lambda) + D_{\text{Кар}}(\lambda),$$

$$D_{\text{Хла}}(\lambda) = C_{\text{Хла}} \varepsilon_{\text{Хла}} \left(1.80 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 403}{17.0} \right)^2} + 2.13 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 434}{20.9} \right)^2} + 0.40 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 620}{29.5} \right)^2} + 0.97 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 678}{13.0} \right)^2} \right), \quad (8)$$

$$D_{\text{Фико}}(\lambda) = C_{\text{Фико}} \varepsilon_{\text{Фико}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 609}{73.7} \right)^2},$$

$$D_{\text{Кар}}(\lambda) = C_{\text{Кар}} \varepsilon_{\text{Кар}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 482}{38.6} \right)^2}.$$

где: $D(\lambda)$ – общая оптическая плотность, отн. ед; $D_{\text{Хла}}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла *a*; $D_{\text{Фико}}(\lambda)$ – оптическая плотность фикобилинов; $D_{\text{Кар}}(\lambda)$ – оптическая плотность суммарных каротиноидов; $C_{\text{Хла}}$ – концентрация хлорофилла *a*, г·л⁻¹; $C_{\text{Фико}}$ – концентрация фикобилинов, г·л⁻¹; $C_{\text{Кар}}$ – концентрация суммарных каротиноидов, г·л⁻¹; $\varepsilon_{\text{Хла}}$ – экстинкция хлорофилла *a* – 88.15 л·г⁻¹·см⁻¹ [39]; $\varepsilon_{\text{Фико}}$ – экстинкция фикоцианина – 7.3 л·г⁻¹·см⁻¹ [40]; $\varepsilon_{\text{Кар}}$ – экстинкция суммарных каротиноидов – 255 л·г⁻¹·см⁻¹ [39].

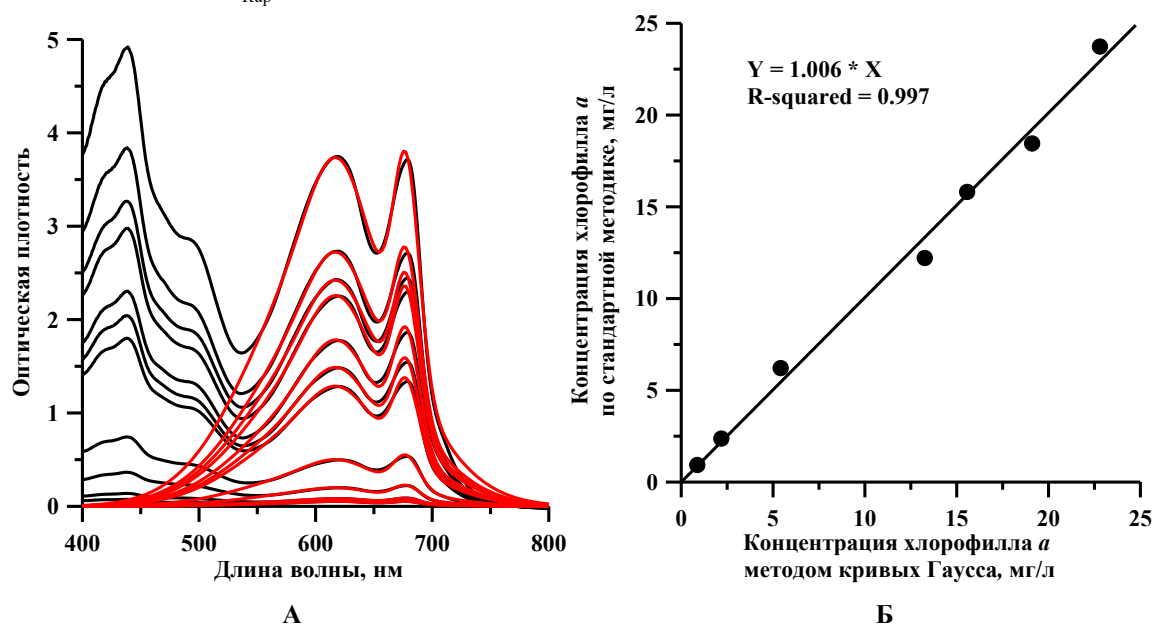


Рис. 4. А – аппроксимация истинных спектров поглощения выражением (9). Б – концентрация хлорофилла *a*, определённая по стандартной методике и при помощи модели (9).

Для упрощения математических расчётов, при декомпозиции спектра поглощения можно только рассматривать красную (550–750 нм) область спектра, которая позволит определить концентрации основных пигментов (хлорофилла *a* и фикобилины), влиянием каротиноидов этом диапазоне можно пренебречь:

$$D(\lambda) = C_{\text{Хла}} \varepsilon_{\text{Хла}} \left(0.40 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 620}{29.5} \right)^2} + 0.97 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 678}{13.0} \right)^2} \right) + C_{\text{Финко}} \varepsilon_{\text{Финко}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 609}{73.7} \right)^2}. \quad (9)$$

На рисунке 4,А представлена аппроксимация истинных спектров поглощения выражением (9).

Для верификации полученных результатов была проведена серия параллельных измерений концентрации хлорофилла *a* стандартным методом при помощи ацетоновых экстрактов [32] и предлагаемой экспресс методики. Коэффициент экстинкции хлорофилла *a* в ацетоновом экстракте по эталонным справочным данным составляет 88.15 л·г⁻¹·см⁻¹ [39]. В работе [41] по нативным спектрам поглощения и экстрактам хлорофилла в ацетоне для 38 различных культур вычислили коэффициент экстинкции хлорофилла *a* в нативной форме – 76 л·г⁻¹·см⁻¹. По данным [42] для цианопрокариот эта величина составляет 67 л·г⁻¹·см⁻¹ в максимуме поглощения 678 нм. Одним из объяснений различия между нативным коэффициентом экстинкции и коэффициента экстинкции в ацетоновом растворе является эффект «упаковки» пигментов в клетках. Анализируя полученные нами результаты (см. рис. 4,Б), можно сделать вывод, что нативный коэффициент экстинкции культуры *A. platensis* составляет 65 л·г⁻¹·см⁻¹, что практически совпадает с данными работы [42]. Таким образом, предлагаемый способ декомпозиции спектра может быть использован как экспресс-метод определения концентрации пигментов в культуре, без выделения пигментов в чистом виде.

Зависимость коэффициента поглощения света и удельной скорости роста от концентрации хлорофилла *a*

Для расчёта коэффициента поглощения света использовали истинные спектры поглощения:

$$\alpha = \sum_{400}^{750} \delta(\lambda) \cdot \alpha(\lambda), \quad (10)$$

где $\delta(\lambda)$ – доля энергии, приходящаяся на каждую длину волны энергетического спектра лампы в области ФАР; $T(\lambda)$ – пропускание на каждой длине волны; $\alpha(\lambda) = 1 - T(\lambda)$.

Зависимость коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла *a* представлена на рисунке 5,А. Данные с высокой степенью точности ($R^2 = 0.99$) описываются законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$\alpha = 1 - e^{-k \cdot \pi}, \quad (11)$$

где $k = 0.017$ – удельное поглощение, м²·мг⁻¹.

Таким образом, при поверхностной концентрации хлорофилла *a* 1 мг·м⁻² клетки культуры *A. platensis* поглощают около 2 % падающего света, практически 100 процентное поглощение наблюдается при концентрации хлорофилла *a* выше 200 мг·м⁻². Аналогичные расчёты для зелёных морских водорослей показали, что удельный коэффициент поглощения равняется 0.008 м²·мг⁻¹ [33]. По литературным данным известно, что данный параметр определяется спектральным составом света, и варьирует от 0.005 до 0.03 м²·мг⁻¹ для различных систематических групп низших фотоавтотрофов [9].

Полученные результаты позволяют для линейного участка накопительной кривой получить выражение зависимости удельной скорости роста μ культуры *A. platensis* от концентрации хлорофилла a :

$$\mu = \mu_m \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\pi} - \mu_r, \quad (12)$$

где $\mu_m = 1 \text{ сут}^{-1}$ – максимальная удельная скорость роста, определённая на экспоненциальной фазе; $I_0 = 16 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ – облучённость поверхности фотобиореактора; $\mu_r = 0.06 \text{ сут}^{-1}$ – удельная скорость эндогенного расхода биомассы.

На рисунке 5,Б представлена аппроксимация экспериментальных данных выражением (12). Результаты моделирования подтверждают ранее высказанное предположение, что удельная скорость роста культуры на линейном участке накопительной кривой определяется количеством поглощённой биомассой энергии на единицу хлорофилла.

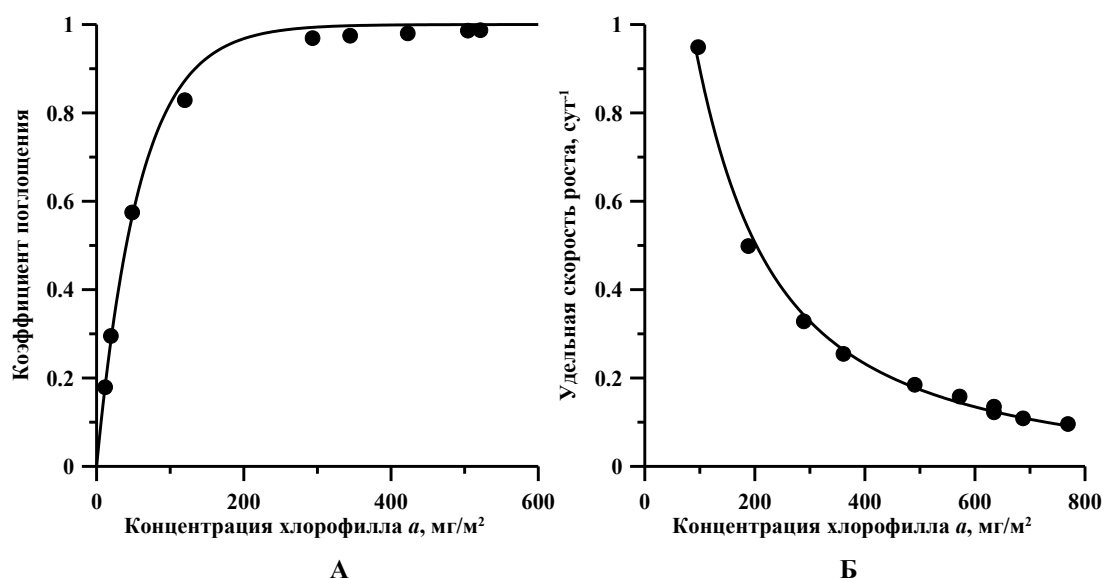


Рис. 5. Зависимость коэффициента поглощения (А) и удельной скорости роста (Б) от концентрации хлорофилла a накопительной культуры *A. platensis*. Линии – аппроксимация экспериментальных данных выражениями (11) и (12) соответственно. Значения коэффициентов в тексте.

Покажем, что постоянство продуктивности кроме световых условий связано с изменением биохимического состава клеток *A. platensis*. По определению, продуктивность равна произведению удельной скорости на биомассу:

$$P = \mu \cdot B. \quad (13)$$

Поставляя (12) в (13), получим:

$$P = \mu_m \cdot \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\pi} \cdot B - \mu_r \cdot B. \quad (14)$$

При любых экспериментальных исследованиях биохимического состава культуры микроводорослей основным параметром является содержание того или иного компонента в биомассе, выраженное в долях или в процентах от сухого веса. Так относительное содержание хлорофилла a запишется в виде:

$$\beta = \frac{\pi}{B}. \quad (15)$$

Из (14) и (15):

$$P = \mu_m \cdot \frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\beta} - \mu_r \cdot B. \quad (16)$$

Для линейной фазы роста продуктивность культуры постоянна: $P = P_m$. Из (16) следует, что это возможно только в случае уменьшения β :

$$\begin{aligned} \mu_m \cdot \frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\beta} &= P_m + \mu_r \cdot B, \\ \beta &= \mu_m \cdot \frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{P_m + \mu_r \cdot B}. \end{aligned} \quad (17)$$

Выражение (17) показывает, что с ростом плотности культуры микроводорослей, относительное содержание хлорофилла a (а значит и общего белка и других структурных компонентов биомассы) гиперболически снижается. На рисунке 6 представлена зависимость относительного содержания хлорофилла a от плотности культуры и расчётная кривая с учётом определённых ранее видоспецифических параметров выражения (17).

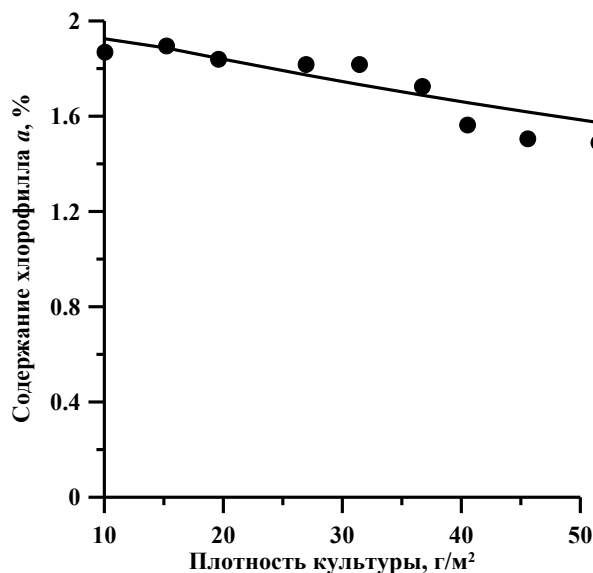


Рис. 6. Зависимость относительного содержания хлорофилла a от плотности культуры *A. platensis* на линейной фазе роста. Линия – расчётная кривая по выражению (17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе приведены простейшие выражения, позволяющие объяснить линейный рост плотности накопительной культуры *A. platensis* в условиях светолитирования. Согласно предлагаемой модели, в области светолитирования величина удельной скорости роста определяется поверхностной облучённостью и концентрацией хлорофилла a в соответствии с выражением (12). При этом видоспецифические константы (количество макроэргов, восстанавливаемых за счёт единицы энергии ФАР, активность ключевого мультиферментного комплекса) можно считать постоянными именно в области невысоких интенсивностей света [19]. Уменьшение удельной скорости роста определяется уменьшением приведённой плотности потока энергии ФАР на единицу хлорофилла a . В свою очередь постоянство продуктивности культуры определяется алгебраической суммой скорости синтеза и эндогенного расхода биомассы. С ростом плотности культуры происходит не только

увеличение потерь биомассы, но и гиперболическое уменьшение содержания хлорофилла *a*, что и приводит к постоянству продуктивности согласно выражению (16). Исходя из предположения о пропорциональности всех структурных компонентов клеток, можно сделать вывод, что доля структурной биомассы в целом с ростом плотности накопительной культуры также снижается. Выяснения механизмов снижения β требует рассмотрения двухкомпонентной модели роста биомассы микроводорослей [19] и её частных решений для оптически плотных культур.

Не менее важным аспектом данной работы является предложение алгоритма количественного описания роста накопительной культуры микроводорослей с использованием спектров поглощения. Используя метод математического моделирования, возможно определить многочисленные структурные и функциональные параметры культуры, не вмешиваясь в процессы её роста, а также использования трудоёмких и затратных биохимических методов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме "Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса" № гос. регистрации 121030300149-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антал Т.К. *Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата к недостатку основных элементов минерального питания*: автореф. дис. док. биол. наук. М., 2018. 46 с.
2. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. *Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе*. М.: Изд-во Института компьютерных исследований, 2020. 332 с.
3. Wu H., Li T., Lv J., Chen Z., Wu J., Wang N., Wu H., Xiang W. Growth and biochemical composition characteristics of *Arthrospira platensis* induced by simultaneous nitrogen deficiency and seawater-supplemented medium in an outdoor raceway pond in winter. *Foods*. 2021. V. 10. doi: [10.3390/foods10122974](https://doi.org/10.3390/foods10122974)
4. Marrez D.A.L., Naguib M.M., Sultan Y.Y., Daw Z.Y., Higazy A.M. Evaluation of chemical composition for *Spirulina platensis* in different culture media. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2014. V. 5. P. 1161–1171.
5. 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 (Setch et Gardner) Geitler*: ph. d. thèse. Paris, 1966. 114 p.
6. Терсков И.А., Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Светозависимый рост водоросли *Platymonas viridis* в непрерывной культуре. *Известия Академии наук СССР. Серия биологическая*. 1981. Т. 2. № 10. С. 103–108.
7. Семененко В.Е. *Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР*. М.: ИФР, 1991. 231 с.
8. Macintyre H.L., Kana T.M., Anning T., Geider R.J. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 2002. Vol. 38. P. 17–38. doi: [10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x)
9. Ефимова Т.В. *Действие спектрального состава света на структурные и функциональные характеристики микроводорослей*: автореф. дис. канд. биол. наук. Севастополь, 2021. 28 с.
10. Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль CO₂-концентрирующего механизма при фотосинтезе микроводорослей. *Физиология растений*. 2000. Т. 47. № 5. С. 801–810.
11. Dyrhman S.T. Nutrients and their acquisition: phosphorus physiology in microalgae.

- Dev. Appl. Phycol.* 2016. V. 6. doi: [10.1007/978-3-319-24945-2_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_8)
12. Sanz-Luque E., Chamizo-Ampudia A., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant. Sci.* 2015. V. 6. No. 899. doi: [10.3389/fpls.2015.00899](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899)
 13. Solovchenko A.E., Selivanova E.A., Chekanov K.A., Sidorov R.A., Nemtseva N.V., Lobakova E.S. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Biochemistry (Moscow)*. 2015. V. 80. No. 11. P. 1508–1513. doi: [10.1134/S0006297915110139](https://doi.org/10.1134/S0006297915110139)
 14. Шоман Н.Ю. Совместное действие света, температуры и обеспеченности азотом на скорость роста и содержание хлорофилла *a* у морских диатомовых водорослей: автореф. дис. канд. биол. наук. Севастополь, 2021. 23 с.
 15. Соломонова Е.С. Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей: автореф. дис. канд. биол. наук. Севастополь, 2021. 23 с.
 16. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 1949. V. 3. P. 371–394.
 17. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interaction in phytoplankton. *J. Plan. Res.* 2001. V. 23. P. 977–997.
 18. Nisbet R.M., Jusup M., Klanjscek T., Pecquerie L. Integrating dynamic energy budget (DEB) theory with traditional bioenergetic models. *J. Experim. Biol.* 2012. V. 215. P. 892–902. doi: [10.1242/jeb.059675](https://doi.org/10.1242/jeb.059675)
 19. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Двухкомпонентная модель роста микроводорослей в плотностате. *Математическая биология и биоинформатика*. 2021. Т. 16. № 1. С. 101–114. doi: [10.17537/2021.16.101](https://doi.org/10.17537/2021.16.101)
 20. Абакумов А.И., Пак С.Я. Моделирование процесса фотосинтеза и оценка динамики биомассы фитопланктона на основе модели. *Математическая биология и биоинформатика*. 2021. Т. 16. № 2. С. 380–393. doi: [10.17537/2021.16.380](https://doi.org/10.17537/2021.16.380)
 21. Копытов Ю.П., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В., Новикова Т.М. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*. 2015. Т. 25. № 2. С. 35–40.
 22. Naqvi K.R., Merzlyak M.N., Melo T.B. Absorption and scattering of light by suspensions of cells and subcellular particles: an analysis in terms of Kramers-Kronig relations. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. V. 3. P. 132–137.
 23. Kupper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analyt. Chem.* 2007. V. 79. No. 20. P. 7611–7627.
 24. Lehmuskero A., Skogen Chauton M., Boström T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progr. Oceanogr.* 2018. V. 168. P. 43–56. doi: [10.1016/j.pocean.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002)
 25. Merzlyak M.N., Naqvi K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2000. V. 58. P. 123–129. doi: [10.1016/s1011-1344\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(00)00114-7)
 26. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей. *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 3. С. 464–470.
 27. Krichen E., Rapaport A., Le Floc'h E., Fouilland E. A new kinetics model to predict the growth of micro-algae subjected to fluctuating availability of light. *Algal Research*. 2021. V. 58. P. 102–362. doi: [10.1016/j.algal.2021.102362](https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102362)
 28. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. Энергетика фотосинтезирующей

- культуры микроводорослей. Новосибирск: Наука, 1980. 136 с.
29. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. *Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды*. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011. 152 с.
 30. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1097> (дата обращения: 20.05.2022).
 31. Геворгиз Р.Г., Малахов А.С. *Пересчёт величины освещённости фотобиореактора в величину облучённости*. Севастополь: ООО «Колорит», 2018. 60 с.
 32. Геворгиз Р.Г. *Количественное определение массовой доли хлорофилла а в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl.*: учебно-методическое пособие. Севастополь, 2017. 11 с.
 33. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3. № 1. С. 53–60. doi: [10.21072/mbj.2018.03.1.06](https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.1.06)
 34. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Тренкеншу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* при различных условиях азотного питания. *Экология моря*. 2002. Вып. 62. С. 61–66.
 35. Jallet D., Caballero M.A., Gallina A.A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*. 2016. Vol. 18. P. 51–60. doi: [10.1016/2016.05.014](https://doi.org/10.1016/2016.05.014)
 36. Гуляев Б.А., Литвин Ф.Ф. Первая и вторая производная спектра поглощения хлорофилла и сопровождающих пигментов в клетках высших растений и водорослей при 20°C. *Биофизика*. 1970. Т. 15. № 4. С. 670–680.
 37. Bidigare R.R., Ondrusek M.E., Morrow J.H., Kiefer D.A. In-vivo absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X*. 1990. V. 1302. P. 290–302. doi: [10.1117/12.21451](https://doi.org/10.1117/12.21451)
 38. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1991. Т. 73. No. 1. С. 11–23.
 39. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO, 1997. 661 p.
 40. Стадничук И.Н. *Фикобилиптеины*. *Биологическая химия*. М.: Мир, 1990. 196 с.
 41. Myers J., Graham J.R., Wang R.T. On spectral control of pigmentation in *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 1978. V. 14. No. 4. P. 513–518. doi: [10.1111/j.1529-8817.1978.tb02478.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb02478.x)
 42. Arnon D.I., McSwain B.D., Tsujimoto H.Y., Wada K. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Bioch. Biophys. Acta*. 1974. V. 357. No. 2. P. 231–245. doi: [10.1016/0005-2728\(74\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90063-2)

Рукопись поступила в редакцию 20.05.2022, переработанный вариант поступил 20.06.2022.
Дата опубликования 27.06.2022.

Quantitative Regularities of Growth of *Arthrospira platensis* Batch Culture

Lelekov A.S.¹, Chernyshev D.N.², Klochkova V.S.²

¹*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Russia*

²*The Sevastopol State University, Department of Physics, Sevastopol, Russia*

Abstract. The work focuses on the modeling the light-dependent growth of *Arthrospira platensis*. During the experimental study, we obtained a batch curve, which characterizes the presence of a long linear phase. We showed that the constant culture productivity is determined by the light conditions in which cells are located. The simplest model of the light-dependent growth of a batch culture is proposed. The model is based on the assumption that the specific growth rate is determined by the surface irradiation, the light absorption coefficient, and the concentration of chlorophyll a. Verification of the obtained equations indicates that the constant productivity is observed only in the case of a hyperbolic decrease chlorophyll a content and other structural compounds of microalgal biomass. A method for rapid assessment of the concentration of photosynthetic pigments in the *A. platensis* culture by its absorption spectrum using the sum of Gaussian curves is proposed. Mathematical decomposition of the absorption spectrum of *A. platensis* was carried out, all Gaussian parameters were calculated. For the red part of the spectrum, a simple expression is presented that allows one to estimate the concentration of chlorophyll a and phycobiliproteins. The native extinction coefficient of chlorophyll a at 678 nm was calculated to be $65 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. We proposed an algorithm for determining the concentration of photosynthetic pigments directly from the true absorption spectrum of the *A. platensis* culture without interfering with its growth processes.

Key words: *light intensity, specific growth rate, productivity, absorption spectrum, modeling.*