

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РОСТА КУЛЬТУРЫ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *DUNALIELLA***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

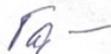
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Акопяна Арама Ашотовича

Научный руководитель:

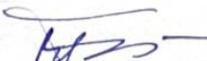
доцент, канд. биол. наук


30.05.2023

А.А. Галицкая

Научный консультант:

профессор, док. биол. наук


30.05.2023

В.А. Богатырев

Зав. кафедрой биохимии и биофизики

профессор, док. биол. наук


30.05.2023

С.А. Коннова

Саратов 2023 год

ВВЕДЕНИЕ

Дуналиелла (*Dunaliella*) – одноклеточная зеленая микроводоросль, принадлежащая к классу: хлорофициевые, порядок: хламидомонадовые, семейство: дуналиелловые, род: дуналиелла. Данная микроводоросль нашла своё применение во многих отраслях промышленности, науки и медицины. Из нее выделяют β-каротин, который могут принимать люди для поддержания уровня витамина А в организме. В науке же ее можно использовать как тест-систему на обнаружение токсичных компонентов.

Для проведения всех возможных действий над культурой дуналиеллы, необходимо поддерживать и выявлять ее жизненно состояние, будь то определение стадии жизненного цикла культуры или последствия влияния на нее токсичных веществ. Методом определения биологического состояния колонии обычно служит спектрофотометрия, но у нее есть свои недостатки, а именно необходимость наличия спектрофотометра и время, за которое проходит анализ. Существует и другой, более перспективный метод, а именно цветометрия. Наличие дорогостоящего оборудования в данном методе не обязательно, и скорость анализа выше, однако вопрос о корреляции анализа в сравнение с зарекомендовавшей себя спектрофотометрии остаётся открытым.

Актуальность данной проблемы объясняется тем, что наличие быстрого и надежного метода анализа состояния культуры является несомненным плюсом к исследованиям, нуждающимся в получении скорого результата. Преимущество данного метода над остальными — это отсутствие возможной контаминации, не происходит повреждение клеток микроводорослей, а также нет необходимости брать отдельную пробу из среды культивирования. Так же исследования в данной области развивают сферы медицины и косметологии.

Цель работы заключается в разработке системы цветометрической оценки параметров роста (построение кривых роста) культур *Dunaliella salina* при планшетном периодическом культивировании.

Задачи данной работы таковы:

1. Выявить зависимость между условиями среды и количеством хлорофилла в клетке.

2. Оценить возможности цветометрического анализа как неинвазивного метода мониторинга роста культуры.

3. Подобрать оптимальные питательные среды для культивирования штаммов *D. salina*.

Основное содержание работы.

Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает обозначения и сокращения, введение, три раздела (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и их обсуждение), заключение, список использованных источников.

Проанализировано 69 источника иностранных авторов. Они составили теоретическую и методологическую основу исследования.

В разделе Материалы и методы описана структура экспериментов, перечислены основные методики. Для исследования роста культур микроводорослей рода *Dunaliella* использовались методы спектрофотометрии и цветометрии.

В разделе Результаты и их обсуждение представлен экспериментальный материал и анализ полученных результатов.

В эксперименте было необходимо проанализировать питательные среды, с целью нахождения оптимальных сред как для быстрого набора биологической массы, так и для поддержания культур. Так же стояла цель тестирования метода цветометрии. Цветометрия - не инвазивный метод исследования культур микроорганизмов, в частности микроводорослей. Запись изображений осуществляли на камеру смартфона с различными временными интервалами, блокировкой автоматической экспозиции и баланса белого. В программе ImageJ создавали пакет изображений File/Import/Image sequence. Усредненные по выделенной области интересов (изображение лунки) уровни цветности, получали с помощью инструмента «Histogram» во вкладке Analyze. Значения измеряемого

канала цвета $V(r)$, $V(g)$, $V(b)$ из показателя Mode заносили в таблицы Excel и пересчитывали значения по формуле:

$$\ln V(r) = \log_e(V(\text{rgb})_0 / V(\text{rgb})_i),$$

Где $V(\text{rgb})_0$ – значение уровня цветности канала лунки бланка (без водорослей), а $V(\text{rgb})_i$ – значение того же канала i -й лунки.

Данные получены с двухнедельного эксперимента, где сбор данных проходил раз в 3-4 дня. Устанавливался планшет без крышки в ридер BioTek, и начиналось измерение спектров.

Как представлено на рисунках 1-4, линии микроводорослей D-203, D-209, D-714, D-294 растут с различной эффективностью на разных средах.

На рисунке 1 представлен рост различных линий микроводоросли на среде Ben-Amotz. Наиболее эффективно нарабатывают биологическую массу линии D-209 и D-294, на первые же сутки начинается активный рост, к пятым суткам культуры выходят на плато. Микроводоросли D-203 растут на среде Ben-Amotz размерено, что подходит для поддержания культуры продолжительное время без необходимости быстрого набора биологической массы. Микроводоросли D-714 начинают активный рост на первые же сутки, но к пятым суткам рост прекращается, и культура начинает погибать.

На рисунке 2 представлен рост различных линий микроводоросли на среде Artificial sea water. Рост культур D-714, D-294 и D-209 идет до пяток суток, затем идет отмирание. Линия D-294 обладает наибольшим приростом биологической массы. D-203 не набирает большую биологическую массу, культура отмирает почти сразу.

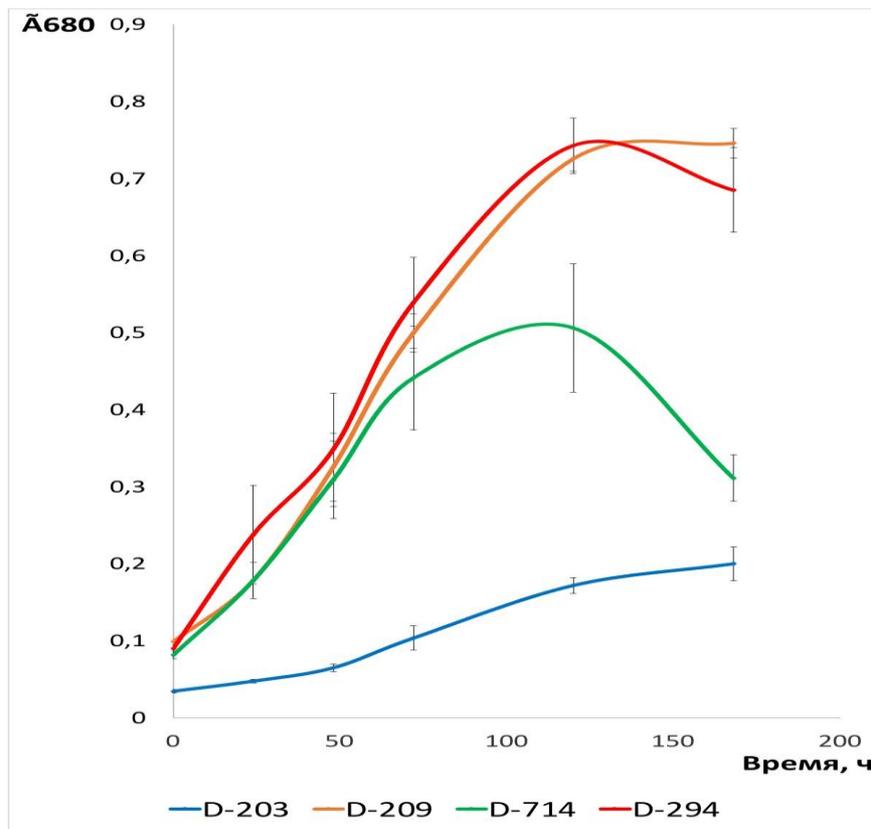


Рисунок 1 – Кривые роста культур *D. salina* на среде Ven-Amotz спектрофотометрические данные.

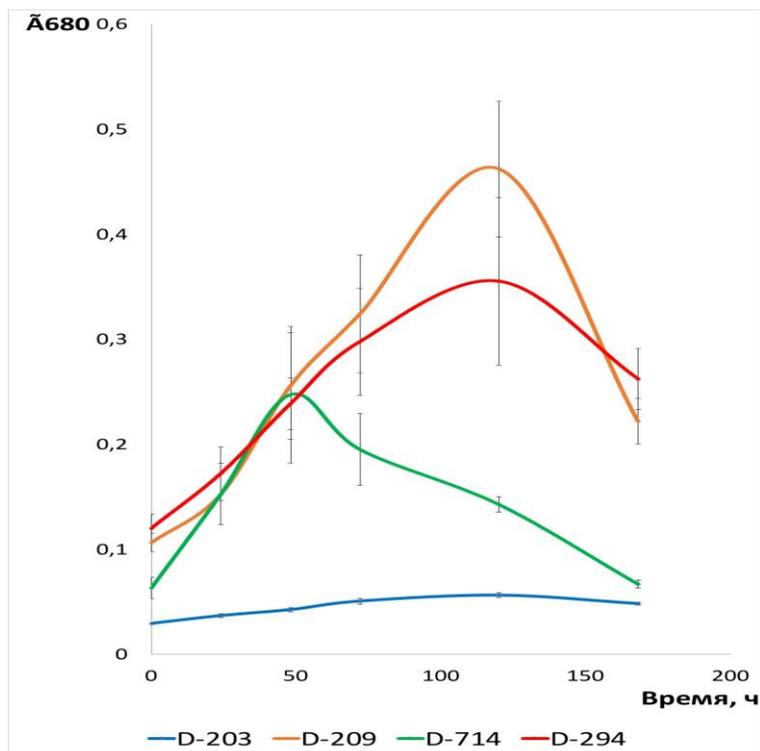


Рисунок 2 – Кривые роста культур *D. salina* на среде Artificial Sea water, спектрофотометрические данные.

На рисунке 3 представлен рост культур на среде Ramaraja. Линии D-209 и D-294 начинают логарифмический рост на вторые сутки и завершают на пятые, затем идет активное отмирание культур. Микроводоросль D-714 активно растет со вторых суток до третьих, а затем культура активно теряет биологическую массу. D-203 на протяжении всего эксперимента идет размеренный рост, на пятые сутки идет небольшой спад биологической массы.

На рисунке 4 представлен рост микроводорослей на среде крымских солей. Линии D-294 и D-209 активно растут с первых суток до пятых суток, затем следует небольшой спад роста и выход на плато на шестые сутки. D-714 идет рост до третьих суток с последующим выходом на плато до пятых суток, затем идет отмирание культуры. Микроводоросли D-203 не дают активного роста, размеренный прирост без отмирания культуры подходит для поддержания культуры без активного набора биомассы.

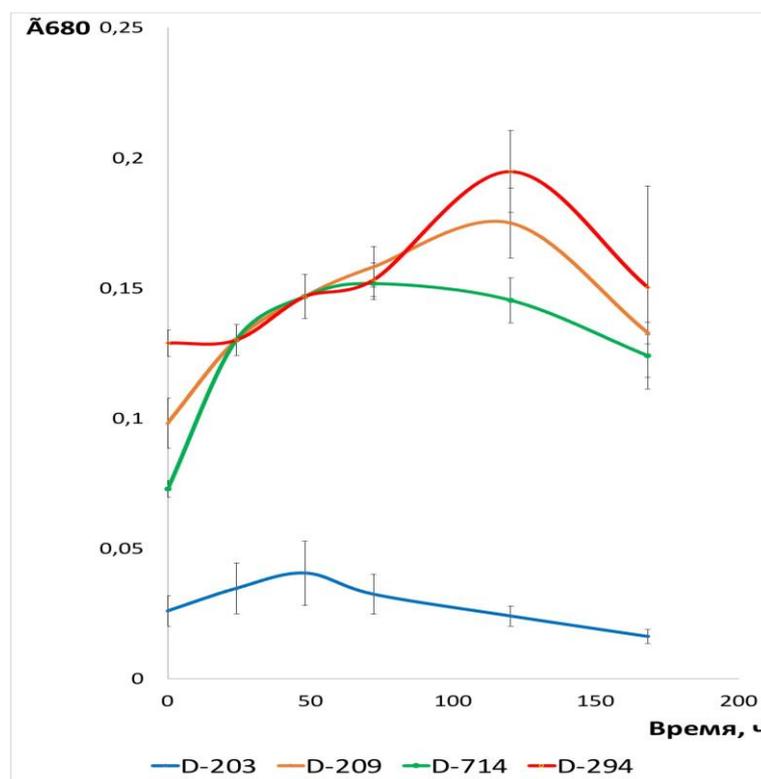


Рисунок 3 – Кривые роста культур *D. salina* на среде Ramaraja, спектрофотометрические данные.

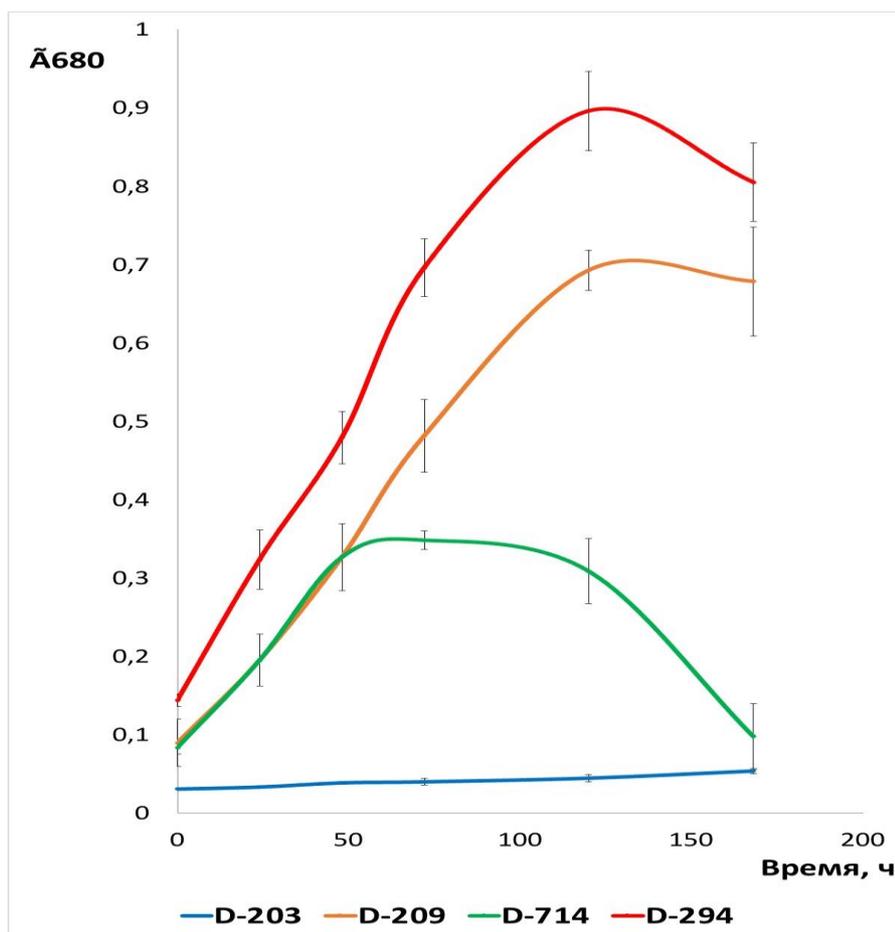


Рисунок 4 – кривые роста для культур росших на среде на основе крымской соли, спектрофотометрические данные.

3.1.2 Цветометрия

Данные, полученные при цветометрии, отображены на рисунках 5-8. Графики построены на основе анализа красного спектра снимка, так как он передаёт наиболее точные данные. Анализ данных показывает, что коэффициент корреляции для массивов \tilde{A}_{680} и LnR (красного канала) составляет 0,92, а для \tilde{A}_{680} и LnB – 0,80. Этот результат вполне объясним, если принять во внимание, что хлорофиллы имеют два основных максимума поглощения в красной и синей областях спектра видимого диапазона, в то время как каротиноиды – только в синей. В случае построения графика идет падение концентрации красного, так как в комфортных случаях идет активная выработка хлорофиллов и низкая выработка β -каротина, который отвечает за красную окраску у микроводорослей *Dunaliella* и наоборот, в стрессовых условиях идет активная выработка β -каротина.

На рисунке 5 представлены кривые роста культур на среде Ven-Amotz. Все линии микроводорослей показывают одинаковый результат - до пятых суток идет прирост красного спектра поглощения, на шестые сутки идет его резкое падение.

На рисунке 6 представлены кривые роста культур на среде Artificial sea water. Линии D-203 и D-714 не выделяют большого количества каротиноидов до пятых суток, к шестым суткам идет падение содержания красного пигмента. В культуре D-209 и D-294 идет падение содержания красного спектра до четвертых суток, к пятым суткам замечен небольшой прирост, на шестые сутки концентрация падает.

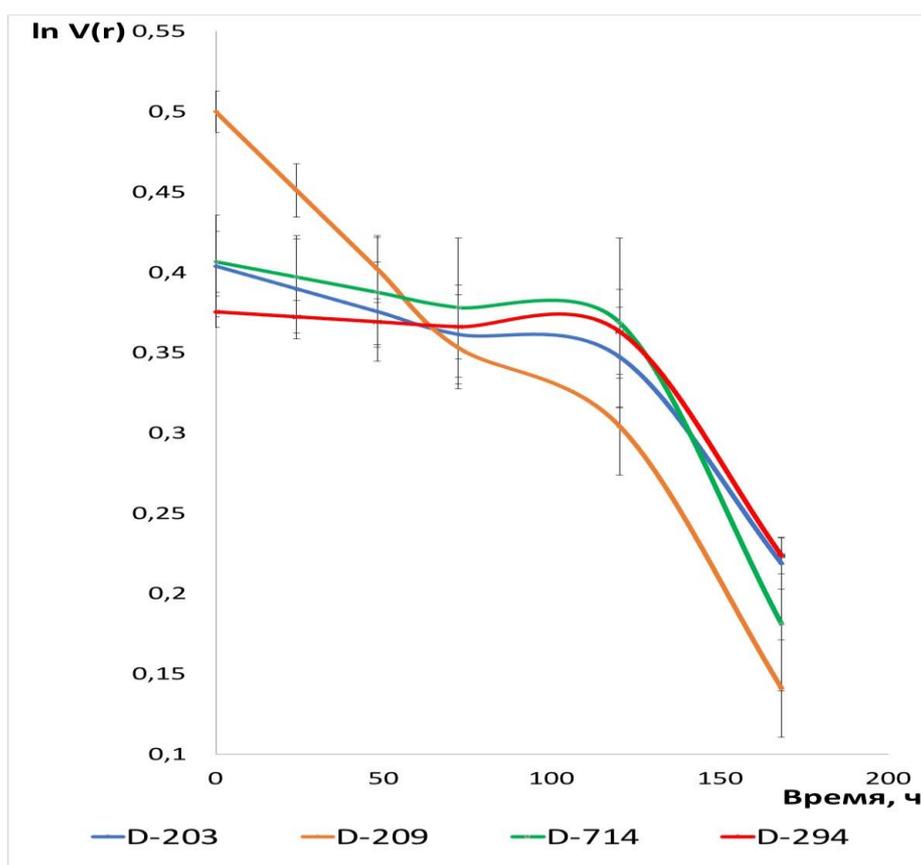


Рисунок 5 – Кривые роста культур *D. salina* на среде Ven-Amotz, цветометрические данные.

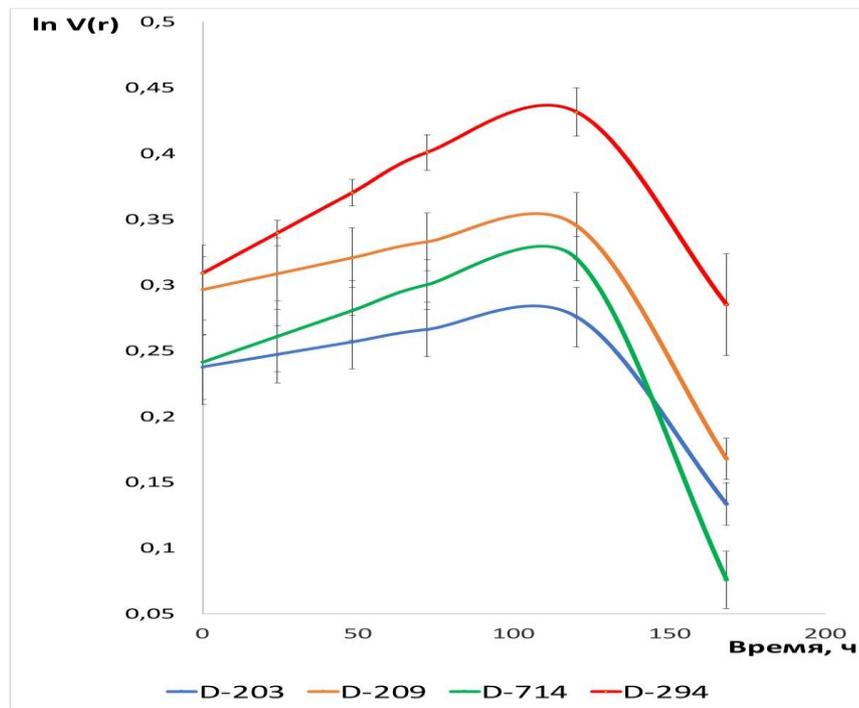


Рисунок 6 – Кривые роста культур *D. salina* на среде Artificial sea water.

На рисунке 7 представлены кривые роста культур на среде Ramaraja. Линии микроводоросли D-203, D-714 и D-294, развиваются одинаково, до пятых суток культуры не меняют своей концентрации красных пигментов, на шестые идет падение концентрации. D-209 теряет концентрацию красных пигментов до четвертых суток, на пятые идет небольшой прирост, к шестым суткам концентрация вновь снижается.

На рисунке 8 представлены кривые роста культур на среде крымской соли. Линии микроводорослей D-203, D-209 и D-714 никак не изменяют концентрацию красных пигментов до пятых суток, к шестым суткам идет падение данной концентрации. Культура D-294 дает прирост красных пигментов до пятых суток, затем, на шестые сутки концентрация падает.

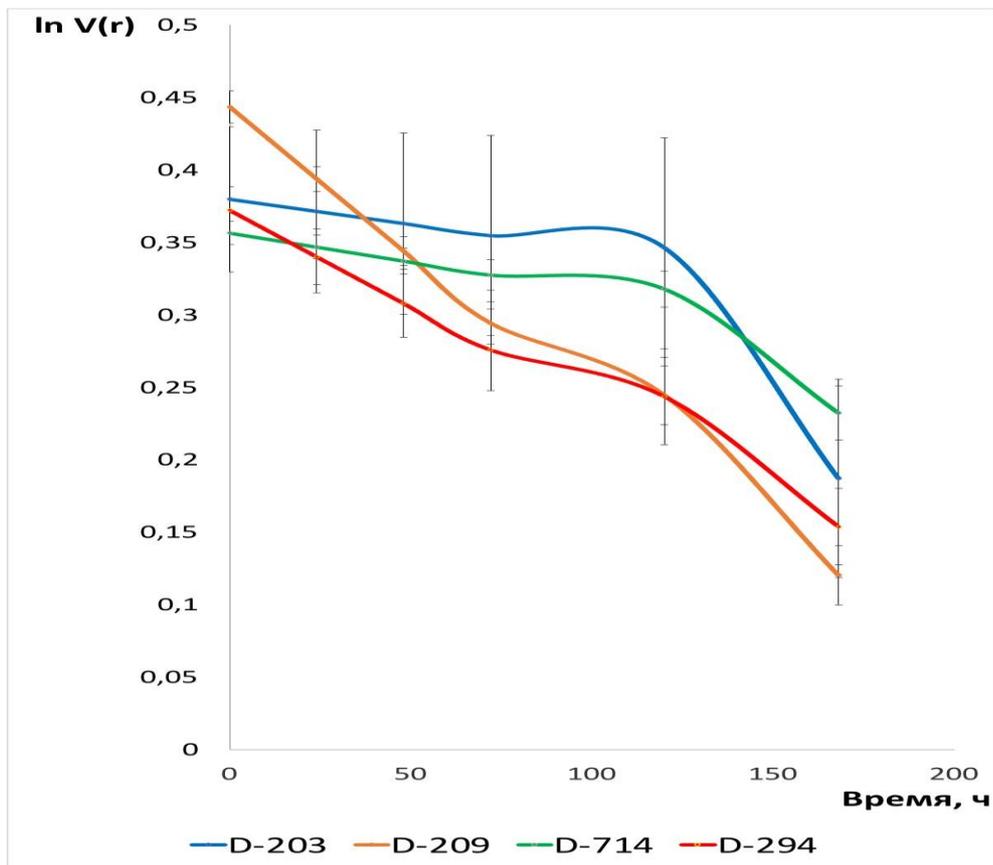


Рисунок 7 – Кривые роста культур *D. salina* на среде Ramaraja,

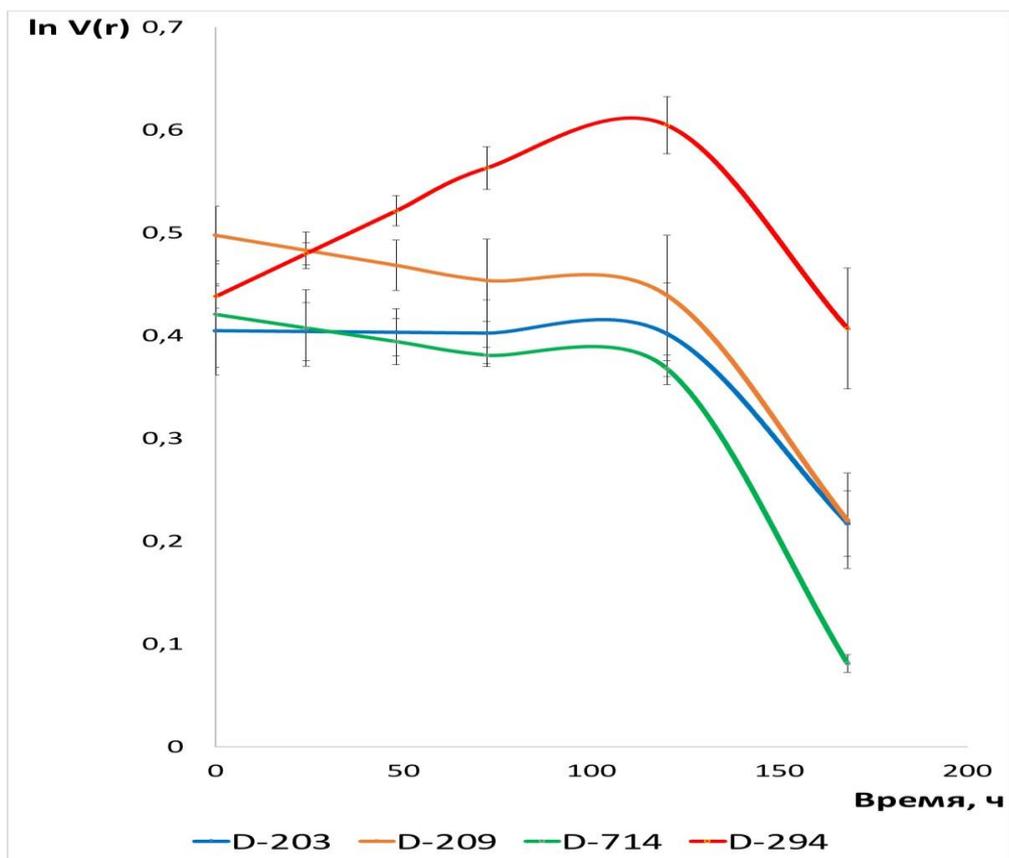


Рисунок 8 – Кривые роста культур *D. salina* на среде на основе крымской соли, цветометрические данные.

3.2 Результат тестирования культуральных сред

В культивировании микроводорослей было использовано несколько сред. По их результатам было выявлено, что культуральная среда Ven-Amotz является наиболее оптимальной для всех штаммов. Активный рост водорослей на среде Ven-Amotz может быть обусловлено большим содержанием фосфора в среде. Данный химический элемент отвечает за качество фотосинтеза, за лучшее усваивание клетками магния и калия.

В таблице представлено сравнение наличие компонентов в различных питательных сред.

Таблица – Сравнительная таблица компонентов различных питательных сред

Компоненты	Среда Ven-amotz (BA)	Среда Artificial sea water (ASW)	Среда-Ramaraja (RAM)
1	2	3	4
NaCl	1,5M	-	1,5M
MgSO ₄ ×7H ₂ O	5mM	0,5mM	0,005M
NaHCO ₃	50mM	25mM	0,025M
KH ₂ PO ₄	-	-	0,0001M
K ₂ HPO ₄	0,2mM	0,13mM	-
KNO ₃	25mM	5mM	0,005M
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,3mM	3mM	0,0003M
EDTA	30мкМ	0,02mM	-
FeCl ₃	2мкМ	-	-
MnSO ₄ ×7H ₂ O	7мкМ	-	-

Продолжение таблицы

1	2	3	4
CuCl ₂	1мкМ	-	-
ZnSO ₄ ×H ₂ O	1мкМ	0,8ммМ	-
CoSO ₄	1мкМ	-	-
FeCl ₃ ×6H ₂ O	-	-	0,000001М
CuSO ₄ ×5H ₂ O	-	0,00007ммМ	-
CoCl ₂ ×6H ₂ O	-	0,2ммМ	0,0003М
MnCl ₂ ×4H ₂ O	-	10ммМ	0,01М
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	-	2ммМ	-
H ₃ BO ₃	-	50ммМ	0,15М
KCl	-	-	0,003М
Na ₂ EDTA	-	-	0,0002М
NaVO ₃	-	1,5ммМ	0,002М
MgCl ₂ ×6H ₂ O	-	4,5ммМ	-
FeCl ₃	-	0,02ммМ	-
ZnCl ₂	-	-	0,0008М
Na ₂ MoO ₄	-	-	0,003М
CuCl ₂ ×6H ₂ O	-	-	0,0002М

В сводную таблицу не внесены данные по среде из крымской соли, так как производитель не указал концентрацию содержащихся компонентов.

По данной таблице можно выявить, что содержание фосфора, магния и калия наибольшее в среде Ven-Amotz. Содержание этих компонентов сильнее всего влияет на жизнедеятельность микроводорослей, так как это ключевые компоненты,

участвующие в фотосинтезе. В следствии чего формируется больше хлорофилла, и синтез питательных веществ идет активнее. Так же идет активный рост на среде крымской соли так как она так же обогащена компонентами из природной среды микроводорослей. Рост культур на среде Ven-Amotz и крымской соли. наибольшей по этой причине. Среда Artificial sea water в среднем даёт размеренный, поддерживающий рост, что позволяет использовать ее для поддержания микроводорослей в стабильном состоянии. Среда Ramaraja проявляет себя по разному для различных культур, что делает ее не оптимальной, а скорее вариативной для определенных линий культур. [5]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложен метод оперативного слежения за динамикой развития культуры микроводоросли *D. salina*, который позволяет строить кривые роста и решать многопараметрические задачи по оптимизации культивирования микроводорослей, в том числе при работе с большими массивами образцов.
2. На фоне оптимального состава сред Ven-Amotz и раствора крымской соли, рост идет наиболее активно у всех штаммов микроводоросли. Среда Artificial sea water стимулирует стабильный, размеренный рост для дуналиеллы. Среда Ramaraja очень вариативна в своём проявлении роста для разных линий.

