

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ  
ОЦЕНКИ РОСТА КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

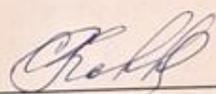
Студентки 3 курса 331 группы  
направления подготовки 06.04.01 - Биология  
биологического факультета  
Гафуровой Виктории Сергеевны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент

  
\_\_\_\_\_  
09.12.24

А. А. Галицкая

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

  
\_\_\_\_\_  
09.12.24

С. А. Коннова

Саратов 2024 год

## ВВЕДЕНИЕ

Впервые обнаруженная в 1838 году в солончаковых испарительных прудах на юге Франции Мишелем Феликсом Дюналем, *Dunaliella* была названа в честь своего первооткрывателя в 1905 году.

За столетие, прошедшее с момента ее официального описания, *Dunaliella* стала удобным модельным организмом для изучения адаптации водорослей к соли. Установление концепции органических совместимых растворов для обеспечения осмотического баланса во многом основывалось на изучении видов *Dunaliella*. Более того, массивное накопление  $\beta$ -каротина некоторыми штаммами при подходящих условиях роста привело к интересным биотехнологическим применениям.

В связи с этим необходим универсальный способ для определения состояния культуры. Как правило, таким методом служит спектрофотометрическое определение содержания хлорофилла. Данный метод имеет некоторые недостатки, такие как высокая стоимость оборудования, что делает его доступным не для всех лабораторий.

При выборе метода перед нами стояли две основных цели: не допустить контаминации, если культура поддерживается в аксеничных условиях, и найти способ проанализировать образец без погрешности от светорассеивания суспензий.

Был предложен новый метод работы с *Dunaliella* – цветометрия. Он не требует дорогого оборудования, а для анализа не нужно брать отдельные пробы из среды культивирования.

Цель данной работы – отработать систему цветометрической оценки роста культуры *Dunaliella salina*.

Достижение указанной цели осуществлялось путём решения следующих задач:

- 1) выявить зависимость между ростом культуры и питательной средой;
- 2) оценить корреляцию результатов цветометрического анализа, микроскопии и метода подсчета клеток на камере Горяева;
- 3) оценить возможность применения цветометрического анализа как неинвазивного метода определения роста культуры.

Объектом исследований были выбраны несколько штаммов *Dunaliella salina*:

1. IPPAS D-203 (*Dunaliella salina*);
2. IPPAS D-209 (*Dunaliella salina*);
3. IPPAS D-714 (*Dunaliella sp.*);
4. IPPAS D-294 (*Dunaliella salina*).

Выявление зависимости между средой для культивирования и ростом культуры определяли с помощью цветометрического анализа, микроскопии и подсчета клеток на камере Горяева.

Работа состоит из 5 глав: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен из 60 источников.

**Основное содержание работы.** Для достижения данной цели и задачи мы исследовали влияние питательной среды на изменение роста культуры, и проанализировали корреляцию между результатами трех методов.

Микроводоросли культивировали в условиях дневной освещённости при комнатной температуре. Условия для всех штаммов были одинаковы: одинаковая освещенность, соотношение культуры и питательной среды, влажность и др.

Культивирование производили в планшетах для культивирования клеточных культур.

В эксперименте были использованы 3 среды для культивирования:

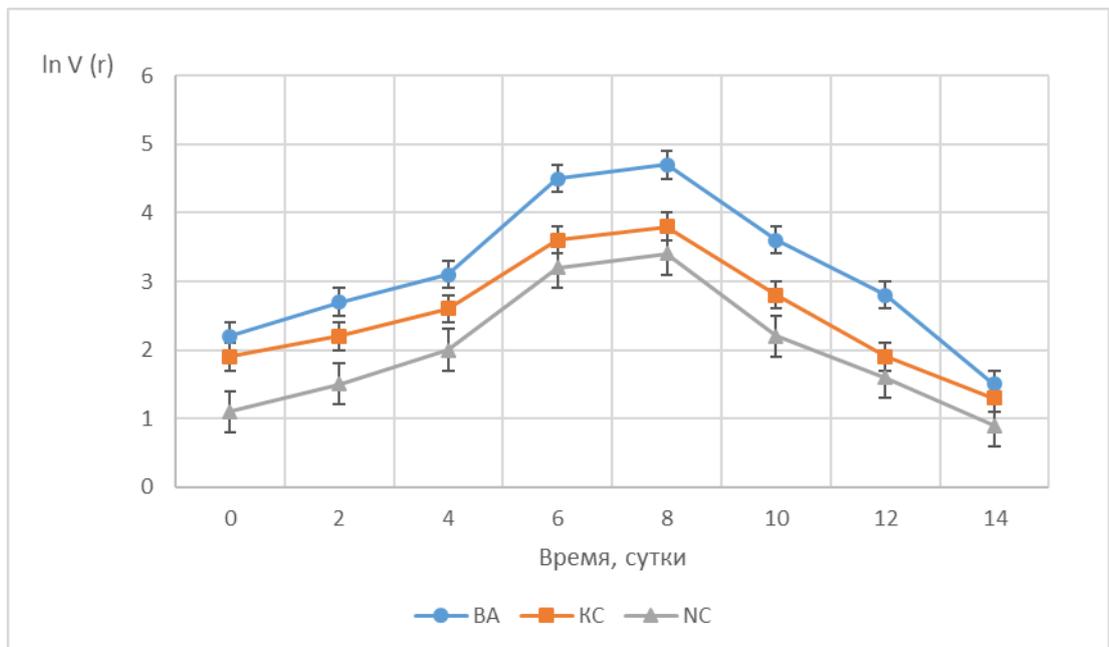
1. Среда Ven-Amotz (pH 8);
2. Крымская соль;
3. Среда с добавлением NaCl.

Цветометрический анализ — это метод определения концентрации химического элемента или химического соединения в растворе с помощью цветного реагента. Он применим как к органическим соединениям, так и к неорганическим соединениям и может использоваться как с ферментативной стадией, так и без неё. Этот метод широко используется в медицинских лабораториях и в промышленных целях, например, для анализа проб воды в связи с промышленной очисткой воды.

Запись изображений осуществляли на камеру смартфона с различными временными интервалами, блокировкой автоматической экспозиции и баланса белого.

Хлорофилл имеет два основных максимума поглощения в красной и синей областях спектра, каротиноиды - только в синей. Так как в комфортных условиях идет активная выработка хлорофиллов и низкая выработка  $\beta$ -каротина и наоборот, в стрессовых условиях идет активная выработка  $\beta$ -каротина, графики построены на основе данных красного спектра снимка.

В результате анализа видно, что у штамма D-203 на всех средах наблюдается прирост пигмента до 8 суток, затем культура начинает погибать. Результат показан на рисунке 1.



BA - среда Ben-Amotz, KC - среда на основе крымской соли, NC - среда с добавлением NaCl.

Рисунок 1 – Рост культуры D-203.

Среда крымских солей и среда с добавлением NaCl не дают активного прироста красного пигмента у штамма D-209 до 8 суток, к пятым идет небольшой прирост, после 10 суток резкое падение концентрации красного спектра в культурах. На среде Ven-amotz наблюдается активный рост пигмента, затем уровень красного цвета в среде падает.

У культуры штамма D-294 на средах Ven-amotz и среде крымских солей идет активный прирост красных пигментов до 8 суток, затем наблюдается падение концентрации. На среде с добавлением NaCl наблюдается пик роста на 12 сутки, затем спад концентрации.

Среда крымских солей не дает активного прироста красного пигмента до 8 суток у микроводорослей D-714, далее прирост на 4 дня и падение красного спектра в культурах. На среде Ven-amotz идет активный пророст концентрации, но на 12 сутки концентрация красного цвета в среде падает. Среда с NaCl практически не даёт прирост до 8 суток, затем наблюдается быстрое падение концентрации.

На среде Ven-amotz все штаммы микроводорослей, кроме D-714, показывают прирост красного спектра поглощения до 8 суток, затем у всех культур наблюдается спад. Водоросли D-714 продолжают расти до 10 суток, затем, как и в других штаммах, наблюдается падение концентрации пигмента.

На среде крымских солей штаммы микроводорослей D-203 дают прирост концентрации до 8 суток, затем наблюдается спад. D-209 практически не изменяют концентрацию красных пигментов до 6 суток, к 8 суткам идет прирост данной концентрации, после 12-х падение. Штаммы D-294 и D-714 дают прирост красных пигментов до 8 и 10 суток, соответственно, затем концентрация падает.

На среде с добавлением NaCl штаммы D-203 и D-714 показывают рост пигмента к 8 суткам, затем идет падение содержания красного пигмента. В культуре D-209 наблюдается небольшой пик на 6 сутки, затем падение. Штаммы D-294 показывают максимальный скачок концентрации на 12 сутки, затем спад.

Флуоресцентная микроскопия — основной инструмент для наблюдения за физиологией клеток, а также является важным биофизическим инструментом для исследований в живых клетках и в восстановленных препаратах *in vitro*.

С помощью инвертированного микроскопа получают микроскопические изображения дна лунок в режиме флуоресценции. При облучении микроводорослей актиничным синим светом живые клетки флуоресцируют красным.

Для сравнения с цветометрическим анализом был проведен подсчет цифровой концентрации клеток штаммов D-203 и D-294 на флуоресцентном микроскопе.

Влияние среды Ven-Amotz на культивирование штаммов D-203 и D-294 показано на рисунке 2. Исходя из графика видно, что пик концентрации клеток приходится на 8 день у каждого из штаммов, затем наблюдается понижение. При этом, исходя из значений числовой концентрации клеток, наиболее благоприятное воздействие среда оказывает на микроводоросли штамма D-203.

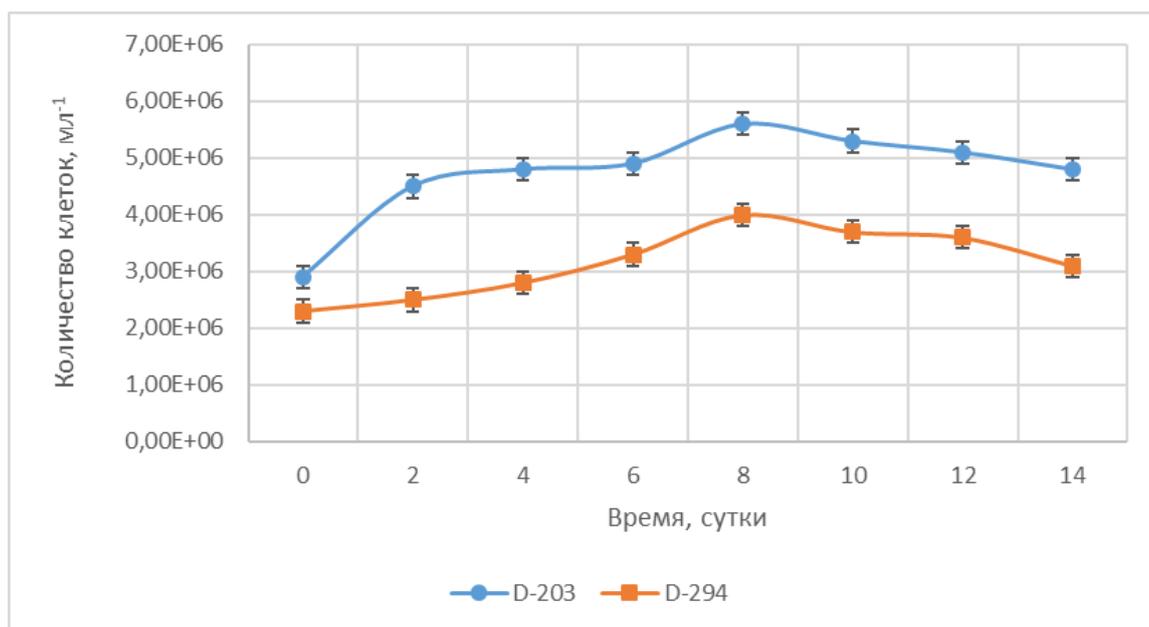


Рисунок 2 – Изменение количества клеток для культур, росших на среде Ven-Amotz по данным микроскопии.

Среда на основе крымских солей дает обратный результат. Наибольший показатель числовой концентрации клеток показывает штамм D-294. При этом, так же, как и на среде Ven-Amotz наибольшая численность клеток водорослей выпадает на 8 сутки, затем культура начинает погибать.

Штамм D-203, выращенный на среде с добавлением NaCl, достигает вершины своей активности на 8 день. Числовая концентрация клеток D-294 продолжает увеличиваться до 12 суток, затем также понижается.

По результатам анализа на флуоресцентном микроскопе штаммов D-203 и D-294 видно, что наиболее высокий показатель роста концентрации клеток дают среды Ven-Amotz (D-203) и среда с добавлением NaCl (D-294).

Традиционным способом оценки числовой концентрации клеток в культурах микроводорослей является подсчет в специальных счетных камерах, к примеру, в камере Горяева (0,9 мл).

Счетная камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло, разделенное прорезями на поперечно расположенные площадки.

Для выращивания и поддержания культуры микроводорослей важно знать ее состояние. Одним из способов является подсчет клеток на камере Горяева.

Видно, что в течение всего эксперимента на среде Ven-Amotz большее количество клеток наблюдалось у штамма D-203. Рост клеток у водорослей продолжался до 8 суток, затем прекратился. Штамм D-294 также показывал прирост до 8 дня. Результат показан на рисунке 3.

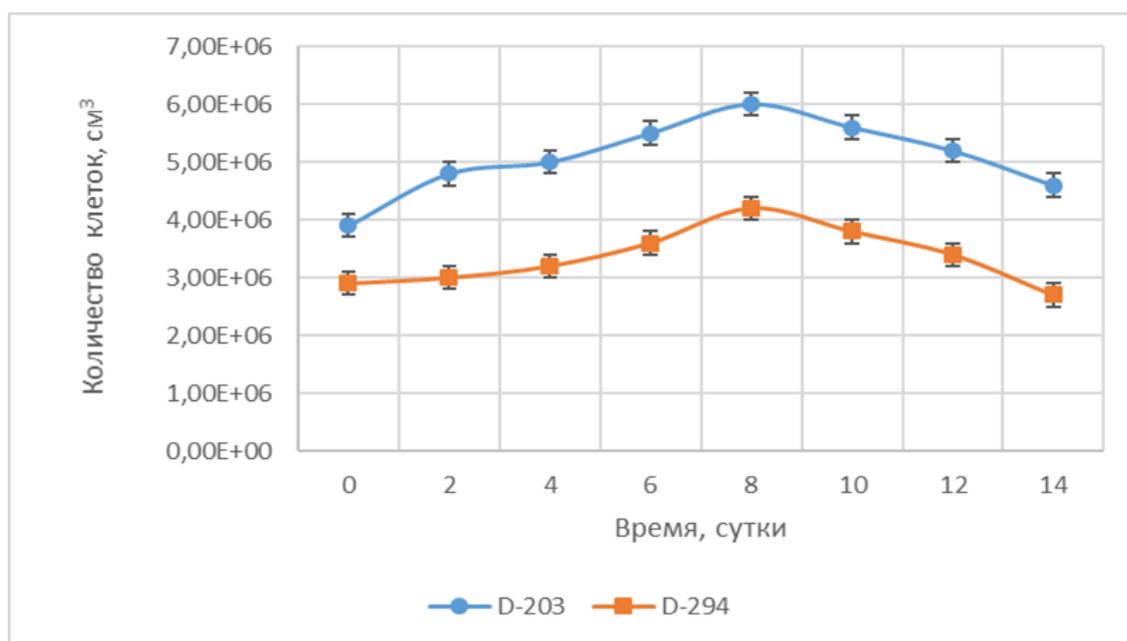


Рисунок 3 – Изменение количества клеток у культур, росших на среде Ven-Amotz по данным камеры Горяева.

Наибольший рост на среде на основе крымских солей показал штамм микроводорослей D-294. Со 2 по 8 сутки рост клеток стремительно увеличивался, затем начал быстро падать.

Штамм D-203 практически не давал прироста первые 4 суток, затем в течение 4 суток концентрация клеток начала увеличиваться, достигнув пика на 8 сутки. Позже культура начала погибать.

На среде с добавлением NaCl штамм D-203 стремительно растет до 8 суток, затем также стремительно количество клеток начинает снижаться.

Микроводоросли штамма D-294 не дают резких скачков в росте, с 6 по 8 сутки количество клеток практически не изменяется. Наибольшая концентрация клеток достигается на 12 сутки, затем рост понижается.

## **Заключение.**

Была выявлена зависимость между средой для культивирования и ростом культуры *Dunaliella salina* посредством использования нескольких методов: цветометрический анализ, микроскопия и подсчет клеток на камере Горяева.

Было показано, что оптимальной средой для большинства штаммов является среда Ven-Amotz. Согласно результатам цветометрического анализа, рост красного пигмента у штаммов D-203 и D-209 был увеличен более чем в 2 раза, штамма D-209 – в 2 раза. Рост количества клеток микроводорослей D-203, D-209 и D-714 также показали данные анализа по флуоресцентному микроскопу и камере Горяева.

Активный рост также наблюдается на среде крымских солей, при этом концентрация клеток водорослей меньше, чем у культур, выращенных на среде Ven-Amotz. Наименьший прирост биологической массы для большинства штаммов наблюдается у культур на среде с добавлением NaCl. Несмотря на это, данная среда является наиболее подходящей для культуры D-294, рост культуры по данным цветометрического анализа увеличился в 1,5 раза. Это делает среду с добавлением NaCl очень вариативной в своём проявлении роста для разных линий.

Было доказано, что цветометрию, как способ оценки состояния культуры, можно использовать, как и остальные методы. Например, согласно цветометрическому анализу штамм D-203, культивируемый на среде Ven-Amotz, достиг пика своего роста на 8 сутки. Эти данные были подтверждены подсчетом численной концентрации клеток с помощью микроскопии и камеры Горяева.

Те же результаты были достигнуты при анализе культуры D-203 на других средах для культивирования. Все 3 метода показали, что водоросли, выращиваемые на среде крымских солей и среде с добавлением NaCl достигли пика логарифмической фазы роста на 8 сутки.

Таким образом, цветометрия с использованием смартфона является не только неинвазивным и удобным способом контроля роста и состояния культур микроводорослей, но еще и точным и чувствительным методом.

*Григорьев*