

3. Клетки *C. closterium* в ходе эволюции приобрели способность утилизировать световую энергию более эффективно в сравнении с планктонными видами, поэтому продуктивность *C. closterium* в сравнении с другими видами микроводорослей выше.

4. Несмотря на то, что клетки цилиндрической формы достаточно малы (6-20 мкм) при сгущении суспензии они агглютинируют и образуют конгломераты, что позволяет использовать наиболее дешевый метод отделения биомассы от культуральной среды – фильтрацию.

Список литературы / References:

1. Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 2009, вып. 20, с. 120-133. [Makarova E.I., Oturina I.P., Sidiyakin A.I. Applied aspects of algae – the inhabitants of aquatic ecosystems. *Optimization and Protection of Ecosystems*, 2009, vol. 20, p. 120-133. (In Russ.)]

2. Волова Т.Г. *Биотехнология*. Новосибирск: СО РАН, 1999, 252 с. [Volova T.G. *Biotechnology*. Novosibirsk, Russian Academy of Sciences, 1999, 252 p. (In Russ.)]

3. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. *Биотехнология микроводорослей*. М.: Научный мир, 2012, 184 с. [Tsoglin L.N. Pronina N.A. *Biotechnology of microalgae*. М.: Science World, 2012, 184 p. (In Russ.)]

4. Онищенко Е.М. К вопросу о путях повышения эффективности наземных открытых систем культивирования микроводорослей. *Живые и биокосные системы*, 2015, № 14, URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-14/article-11>. [Onischenko E.M. The question on how to improve the efficiency of public land microalgae cultivation systems. *Living and biokosny system*, 2015, no. 14, URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-14/article-11> (In Russ.)]

5. Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Темнов М.С. [и др.]. *Технология получения липидов из микроводорослей* [Электронный ресурс]: монография. Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015, 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). [Butler D.S., Butler S., Temnov M.S. [et al.]. *Lipids technology from microalgae* [electronic resource]: Monograph. Tambov: Publishing House of VPO "TSTU", 2015, 1 electron. wholesale. disk (CD-ROM). (In Russ.)]

6. Минюк Г.С., Дробецкая И.В. [и др.] Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор. *МЭЖ*, 2008, № 2, с. 5-23. [Minyuk G.S., Drobetsky I.V. [et al.] Single-celled algae as a renewable biological resource: a review. *International Research Journal*, 2008, no. 2, pp. 5-23. (In Russ.)]

7. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. [и др.]. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. К.: Наукова думка, 1975, 212 с. [Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F. [et al.] *Methods of physiological/biochemical research of algae in hydrobiological practice*. Kiev: Naukova dumka, 1975, pp. 75-212. (In Russ.)]

8. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. *Биологически активные вещества водорослей и качество воды*. К.: Наук. думка, 1998, 256 с. [Sirenko L.A., Kozitskaya V.N. *Bioactive substance of algae and water quality*. Kiev.: Naukova Dumka, 1998, 256 p. (In Russ.)]

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЗАВИСИМОСТИ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ ОТ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Тренкеншу Р.П.¹, Лелеков А.С.², Гаврилов П.Е.², Набойщиков В.С.²

¹ ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ
e-mail: trenkens@yandex.ru

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Аннотация. В работе рассмотрены вопросы применимости уравнения Бугера-Ламберта-Бера при определении биомассы микроводорослей по оптической плотности культуры. Анализ литературных данных показал, что вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также для культур высокой плотности, наблюдаются значительные отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой микроводорослей. Предложена математическая модель, позволяющая описать зависимость оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей в форме степенной функции. Модель основана на предположении о том, что каждая клетка поглощает одинаковое количество световой энергии, не изменяется в размерах и имеет фиксированную площадь поверхности. Показано, что экспериментальные данные зависимости пропускания от биомассы микроводорослей могут быть описаны полученным уравнением с высокой точностью ($R^2 = 0,99$). В отличие от уравнения Бугера-Ламберта-Бера, оптическая плотность культуры и биомасса микроводорослей взаимосвязаны нелинейно.

Ключевые слова: уравнение Бугера-Ламберта-Бера, интенсивность света, коэффициент экстинкции.

MATHEMATICAL MODEL DEPENDENCE OPTICAL DENSITY FROM MICROALGAE BIOMASS

Trenkenshu R.P. ¹, Lelekov A.S. ², Gavrilov P.E. ², Naboyshikov V.S. ²

Institute of Marine Biological Researches A.O.Kovalevsky

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: trenkens@yandex.ru

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Abstract. The applicability of the Beer-Lambert-Bouguer equation in determination microalgal biomass by culture optical density is discussed. Analysis of published data showed that due to the high heterogeneity of microalgae culture, as well as microalgae culture of high density, there is considerable deviation from a linear equation between optical density and microalgae biomass. A mathematical model describing the dependence of optical density from microalgae biomass is proposed. The model is based on the assumption that each cell absorbs the same amount of light energy, is not changed in size and has a fixed surface area. It is shown that experimental dependences of transmittance from the microalgae biomass can be described by the obtained equation with high accuracy ($R^2 = 0.99$). Unlike the equations of the Beer-Lambert-Bouguer, the optical density from microalgae biomass is nonlinear.

Key words: Beer-Lambert-Bouguer law, the light intensity, the extinction coefficient.

Оптический метод определения биомассы микроводорослей является наиболее простым и широко распространенным [1, 2]. В его основе лежит основополагающий закон оптики Бугера-Ламберта-Бера, согласно которому оптическая плотность поглощающего раствора прямопропорциональна концентрации растворенного вещества:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot C},$$

где I, I_0 – интенсивность плоской монохроматической выходящей и падающей на слой вещества l световой волны; ε – коэффициент экстинкции, зависящий от свойств растворенного вещества; C – концентрация растворенного вещества.

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 [3]. Коэффициент экстинкции ε (коэффициент ослабления света) определяется как поглощенной, так и рассеянной световой энергией. 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.

По определению, оптическая плотность раствора на данной длине волны прямопропорциональна концентрации растворенного вещества:

$$D = \varepsilon \cdot l \cdot C.$$

Применительно к культуре микроводорослей, оптическая плотность на длине волны неспецифического поглощения, например 750 нм, прямопропорциональна концентрации клеток в растворе, или биомассе B :

$$D_{750} = \varepsilon \cdot l \cdot B.$$

При постоянстве коэффициента экстинкции ε и фиксированном оптическом пути l , получим линейную взаимосвязь оптической плотности культуры с биомассой микроводорослей:

$$D_{750} = k \cdot B.$$

Однако, вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также для культур высокой плотности, наблюдаются значительные отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой микроводорослей [4]. На рисунке 1 представлена кривая зависимости оптической плотности культуры спирулины *Arthrospira platensis* от её биомассы. Как следует из рисунка, кривая не описывается линейной зависимостью во всем диапазоне данных. В области небольших концентраций клеток, примерно до 0,9 г/л и 0,6 ед. опт. пл., кривая достаточно хорошо описывается линейным уравнением. При нулевом значении биомассы величина оптической плотности также должна равняться нулю, однако полученные результаты свидетельствуют о том, что при нулевой биомассе оптическая плотность должна составлять около 0,03 единиц. Следовательно, даже при малых концентрациях клеток культур микроводорослей применимость закона Бугера-Ламберта-Бера вызывает множество вопросов.

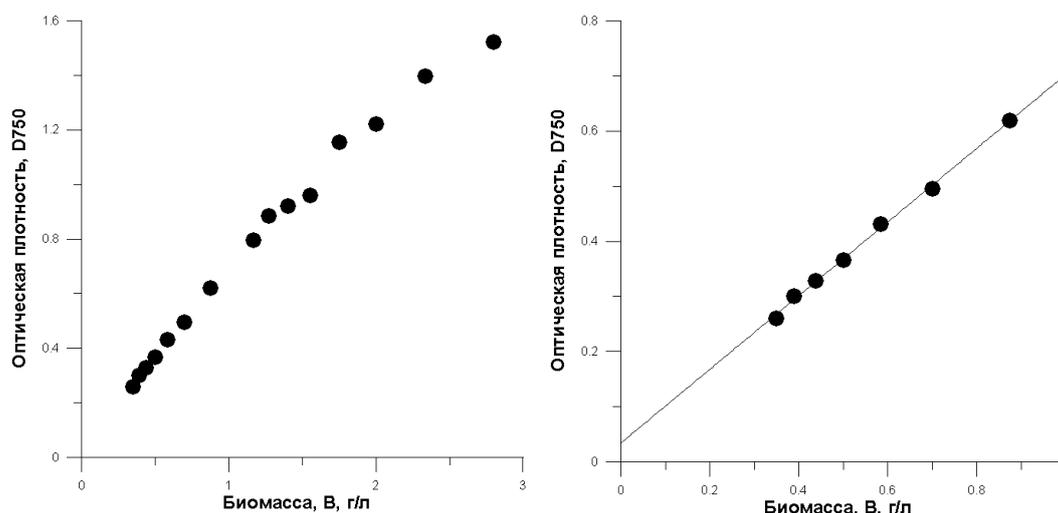


Рисунок 1 – Зависимость оптической плотности культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением линейной регрессии

Следует отметить, что величина оптической плотности, указанная на рисунке 1 рассчитана как отрицательный десятичный логарифм пропускания T . Так как любой оптический прибор определяет именно величину пропускания света, которое есть отношение проходящей световой энергии к падающей, следовательно, при работе с культурами микроводорослей при определении величины оптической плотности необходимо использовать иную зависимость между D и T , нежели в виде десятичного логарифма.

Целью данной работы являлась разработка математической модели зависимости величины пропускания света (оптической плотности) от биомассы микроводорослей.

Математическая модель.

Пусть дана плоскопараллельная кювета, в которой находится культура микроводорослей. Допустим, что клетки представляют собой кубики с площадью боковой грани dS . По литературным данным известно, что одна клетка поглощает около 40 % падающей световой энергии [5], обозначим эту величину через α . Пусть I_0 – интенсивность пучка монохроматического света, падающего на поверхность культуры, Вт/м²; S – площадь поперечного сечения кюветы, I_{np} – интенсивность света, прошедшего сквозь культуру, Вт/м².

Если в кювете находится только одна клетка, то интенсивность поглощенного (I_n) и проходящего через всю поверхность кюветы света будет определяться по формуле:

$$I_n = I_0 \cdot \alpha \cdot \frac{dS}{S}, \tag{1}$$

$$I_{np} = I_0 - I_n. \tag{2}$$

Подставим (1) в (2) и определим I_{np} :

$$I_{np} = I_0 - \frac{I_0 \cdot \alpha \cdot dS}{S}. \tag{3}$$

Вынесем I_0 за скобки и получим:

$$I_{np} = I_0 \left(1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S} \right). \tag{4}$$

Далее правую и левую часть разделим на I_0 :

$$\frac{I_{np}}{I_0} = 1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S}. \tag{5}$$

Так как $\frac{I_{np}}{I_0} = T$, где T – коэффициент пропускания, выражение (5) запишем в виде:

$$T = 1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S}. \tag{6}$$

Аналогично, если в кювете находится не одна, а монослой из n клеток, получим:

$$\frac{I_{np}}{I_0} = 1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}. \tag{7}$$

Выражение (7) получено для монослоя клеток микроводорослей. В реальных условиях для разбавленных культур микроводорослей, в которых клетки не затеняют друг друга, величина коэффициента пропускания будет

также определяться согласно (7). В (7) отношение числа клеток к площади поверхности кюветы называется поверхностной концентрацией. Помножив числитель и знаменатель на длину кюветы l , получим зависимость пропускания от биомассы:

$$T = 1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot l \cdot dS}{S \cdot l}, \quad (8)$$

$$T = 1 - \alpha \cdot B \cdot l \cdot dS. \quad (9)$$

Так как α , l , dS постоянные величины (при условии неизменности размеров клеток), то обозначим их произведение некой константой k . Следовательно, выражение (9) примет вид:

$$T = 1 - k \cdot B. \quad (10)$$

Последнее выражение аналогично закону Бугера-Ламберта-Бера для малых концентраций клеток. Учитывая, что:

$$\begin{aligned} D &= -\lg(T), \\ T &= 10^{-D} = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot B}, \end{aligned} \quad (11)$$

при малых значениях биомассы можно разложить последнее выражение в ряд Тейлора в окрестностях нуля:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot B} \cong 1 - \varepsilon \cdot l \cdot B + \frac{1}{2} \varepsilon \cdot l \cdot B^2 - \dots$$

Ограничившись только первым членом последовательности, получим линейное уменьшение пропускания с ростом плотности культуры (10). На рисунке 2 представлено описание экспериментальных данных зависимости пропускания от биомассы спирулины при малых значениях биомассы.

Если в кювете находится более одного слоя клеток микроводорослей, то поглощенная энергия второго слоя будет определяться долей проходящей энергии первого слоя. Получим выражение для нахождения оптической плотности и коэффициента пропускания для нескольких слоев. Согласно (4) и (7), проходящая энергия для первого слоя:

$$I_{np1} = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \right). \quad (12)$$

Учитывая, что клетки в кювете распределены равномерно, запишем выражение для поглощенной энергии вторым слоем:

$$I_{n2} = \frac{I_{np1} \cdot \alpha \cdot n \cdot dS}{S}. \quad (13)$$

Интенсивность проходящего света через второй слой будет иметь вид:

$$I_{np2} = I_{np1} - I_{n2}. \quad (14)$$

В выражение (14) подставим (12) и получим:

$$I_{np2} = I_{np1} \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \right) = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \right) \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \right) = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \right)^2. \quad (15)$$

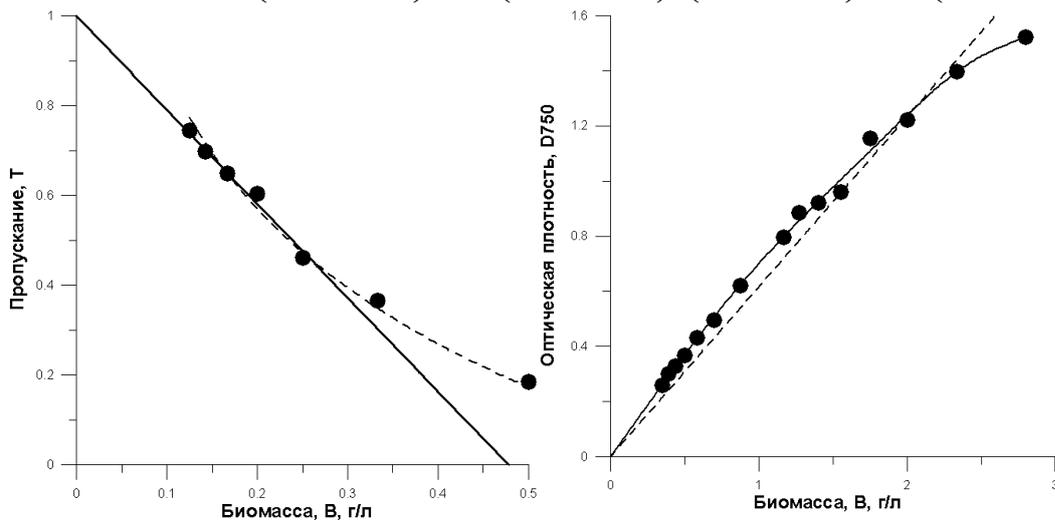


Рисунок 2 – Зависимость пропускания и оптической плотности культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (10) и (21) соответственно. Пунктирная линия – расчёт по уравнению Бугера-Ламберта-Бера

Соотношение (15) дает возможность определить интенсивность прошедшего света через второй слой. Очевидно, что для третьего слоя мы получим выражение аналогичное (15), только в третьей степени. Для k слоев это выражение будет выглядеть так:

$$I_{npk} = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (16)$$

Чтобы найти коэффициент пропускания T , левую и правую часть разделим на I_0 :

$$\frac{I_{npk}}{I_0} = T = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (17)$$

Как и в предыдущем случае, перейдем от поверхностной к объёмной концентрации клеток, помножив левую и правую часть уравнения на длину кюветы:

$$T = \left(1 - \frac{\alpha \cdot B \cdot l \cdot dS}{k}\right)^k. \quad (18)$$

Так как α , l , dS постоянные величины, то обозначим их некоторой константой j . Следовательно, выражение примет вид:

$$T = (1 - j \cdot B)^k. \quad (19)$$

На рисунке 3 представлена аппроксимация уравнениями (18) и (11) зависимости пропускания от биомассы микроводорослей. Анализируя рисунок 3, можно сделать вывод, что, как и для малых концентраций клеток, полученная модель (19) и уравнение Бугера-Ламберта-Бера (11) достаточно хорошо ($R^2 = 0,99$) описывают экспериментальные данные зависимости пропускания от биомассы микроводорослей. Следует отметить, что в отличие от (11), уравнение (19) разработано именно для культур микроводорослей, причём коэффициенты модели имеют строгий биологический смысл (поглощение, площадь поверхности, масса одной клетки).

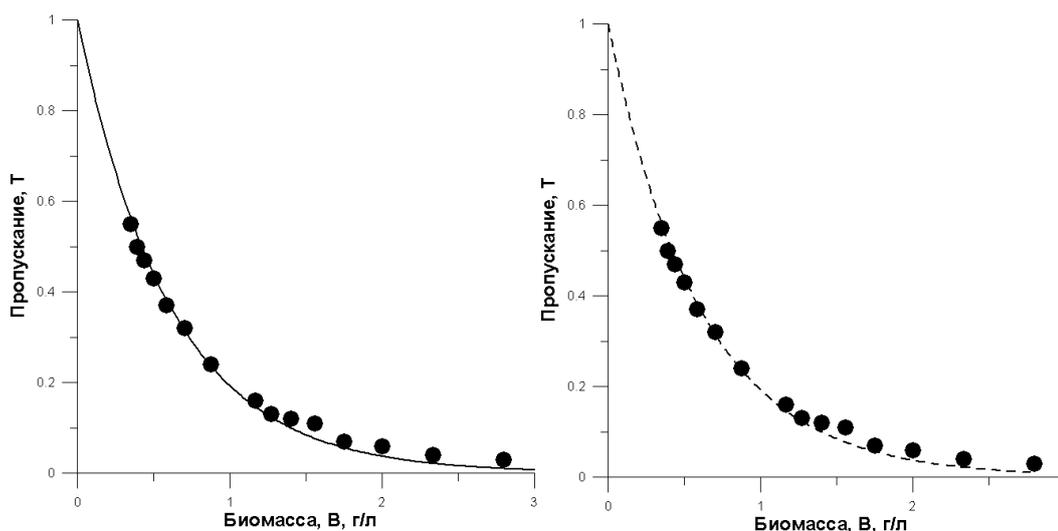


Рисунок 3 – Зависимость пропускания культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (19). Пунктирная линия – расчёт по уравнению Бугера-Ламберта-Бера (11)

Кроме того, предложенный подход позволяет объяснить то, что для культур микроводорослей линейная зависимость между оптической плотностью и биомассой микроводорослей не всегда выполняется. Взаимосвязь величины оптической плотности, которую показывает любой оптический прибор, с биомассой микроводорослей можно записать следующим образом:

$$D = -\lg T.$$

Подставляя (19) в последнее уравнение, получим нелинейную зависимость между величиной оптической плотности и биомассой микроводорослей:

$$D = -\lg(1 - j \cdot B)^k. \quad (20)$$

Для упрощения обработки экспериментальных данных, разложим (19) в ряд Тейлора при малых значениях биомассы, и подставим в (20):

$$D = -\lg\left(1 - j \cdot k \cdot B + \frac{1}{2} \cdot j^2 \cdot k \cdot (k-1) \cdot B^2 - \frac{1}{6} \cdot j^3 \cdot k \cdot (k-1) \cdot (k-2) \cdot B^3 + \dots\right).$$

Вводя обобщенные коэффициенты, окончательно получим:

$$D \cong -\lg(1 - a \cdot B + b \cdot B^2 - c \cdot B^3). \quad (21)$$

На рисунке 2 представлена аппроксимация зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей уравнением (21). Отметим, что предложенная модель с заданной степенью точности описывает отклонения от линейного закона зависимости оптической плотности культуры микроводорослей от ее биомассы. Таким образом, при пересчете величины пропускания, определенного на любом оптическом приборе, в биомассу следует использовать зависимость, вытекающую из (19):

$$B = \frac{1 - \sqrt[k]{T}}{j}, \quad (22)$$

где k и j – видоспецифичные, определённые в предварительных экспериментах константы.

Уравнение (19) является довольно упрощенным, так как не учитывает изменение размеров и содержания биохимических компонентов клеток микроводорослей в процессе роста культуры. Тем не менее, предложенный подход позволяет с достаточно высокой точностью описывать зависимость пропускания и оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей.

Список литературы / References:

1. Chen Y., Vaidyanathan S. A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids. *Anal. Chim. Acta*, 2012, vol. 724, pp. 67-72.
2. Collos Y., Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.J. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.*, 1999, vol. 11, pp. 179-184.
3. Сидько Ф.Я., Ерошин Н.С. Определение концентрации пигментов и числа клеток во взвеси водорослей на фотоэлектроколориметре ФЭКН-57. *Управляемое культивирование микроводорослей*, М.: Наука, 1964, с. 38-42. [Sydko F.Ya., Eroshin N.S. The determination of pigments concentration and cell numbers in algae suspensions on photoelectrocolorimeter FECN-57. *Upravlyаемое kultivirovanie mikrovodorosley*. М.: Наука, 1964, pp. 38-42. (In Russ.)]
4. Геворгиз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 96-106. [Gevorgiz R.G., Alisevich A.V., Shmatok M.G. Estimation of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. biomass by optical density. *Ecologia morya*, 2005, vol. 70, pp. 96-106. (In Russ.)]
5. Фуряев Е.А. *Микроспектрофотометрические характеристики клеток водорослей в различных условиях культивирования*. автореф. канд. дис., Красноярск, 1979, 23 с. [Furyaev E.A. *Microspectrophotometric characteristics microalgae cells in different culture condition*. avtoref. kand. dis., Krasnoyarsk, 1979, 23 p. (In Russ.)]

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРФОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРОСТАТЫ

Савков А.В., Сергей М.А., Булойчик Ж.И., Зажогин А.П., Мавричев А.С., Маслова Г.Т., Державец Л.А.
Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, РБ
e-mail: zajogin_an@mail.ru

Аннотация. Исследована морфология высохшей плазмы крови больных с онкопатологией. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом рак простаты. Показана возможность уточнения диагноза по отнесению опухоли к типу Т₂ или Т₃. Получены полуколичественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли биологических жидкостей и в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологическая жидкость; морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; сдвоенные лазерные импульсы; пространственное распределение, послойный анализ, кальций.