

Рисунок 6 – Зависимость содержания дейтерия в отделах тела мыши группы III от времени после отмены 10% D₂O. На рисунке приведены среднеквадратичные отклонения

В результате работы оценены времена полувыведения дейтерия из воды τ_1 и биополимеров τ_2 тела мыши. Показано, что времена полувыведения дейтерия из воды тела мыши не зависят от отдела, а времена полувыведения дейтерия из биополимеров головного отдела тела мыши отличаются от такового времени для остального тела. Время полувыведения дейтерия из воды тела для здорового и больного животного в среднем не различается.

Список литературы / References:

1. Katz J., Crespi H. Isotope effects in biological system. *Isotope effects in chemical reactions*, 1970, pp. 286-363.
2. Barbour H.G., Allen E. Tumor growth in mice one - fifth saturated with deuterium oxide (heavy water). *Amer. J. Cancer*, 1938, vol. 32, no. 3, pp. 440-446.
3. Katz J.J., Crespi H.L., Hasterlik R.J., Thomson J.F., Finkel A.J. Some observations on biological effects of deuterium, with special references to effects on neoplastic processes. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1957, vol. 18, no. 5, pp. 641-659.
4. Богданов К.М., Романовская Л.Л. Биофизические закономерности обмена тритиевой воды в организме. Москва: Энергоиздат, 1981. [Bogdanov K.M., Romanovskaya L.L. Biophysical regularities of the exchange of tritium water in the body. Moscow: Energoisdat, 1981. (In Russ.)]

РАЗДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *DUNALIELLA SALINA* В ОБЛАСТИ 580-750 НМ

Чернышев Д.Н.¹, Боровков А.Б.²

¹Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

²Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ
e-mail: chernishev@gmail.com

Аннотация. Методом аппроксимации кривыми Гаусса проведено разделение спектра поглощения культуры микроводоросли *Dunaliella salina* на отдельные пики, в области от 580 до 750 нм. Амплитуды отдельных пиков связаны с концентрациями хлорофилла *a* и хлорофилла *b*, параллельно измеренными в образцах по стандартной методике. Установлены соотношения между амплитудами пиков, относящимися к одному пигменту, рассчитаны коэффициенты экстинкции, составлена модель спектра поглощения культуры для определения концентраций хлорофилла *a* и хлорофилла *b*. С помощью модели рассчитаны концентрации пигментов по спектру поглощения культуры. Статистическое отличие от нуля разности значений двух методов измерений проверялось одновыборочным t-критерием. Значения концентраций, измеренных разными методами по хлорофиллу *a* и хлорофиллу *b*, статистически не различаются.

Ключевые слова: микроводоросли, спектры поглощения, хлорофилл.

**SEPARATION OF ABSORPTION SPECTRA OF THE CULTURE *DUNALIELLA SALINA*
IN THE FIELD OF 580-750 NM**

Chernyshev D.N.¹, Borovkov A.B.²

¹Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

²Institute of Marine Biological Research named A.O. Kovalevsky RAS

Nakhimov St., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: chernishev@gmail.com

Abstract: The separation of the absorption spectrum of the microalga *Dunaliella salina* culture was done by the Gauss curve approximation method. The absorption spectrum is divided into separate peaks, from 580 to 750 nm. The amplitudes of separate peaks are related to the concentrations of the chlorophyll a and the chlorophyll b. In the article the relationship between peak amplitudes related to a single pigment are established. The extinction coefficients are calculated. A model of the absorption spectrum of the culture for determining the concentrations of the chlorophyll a and the chlorophyll b was compiled. Using the model, the concentrations of pigments from the absorption spectrum of the culture are calculated. The statistical difference from zero of the difference in the values of the two measurement methods was checked by a single sample t-test. The meanings of the concentrations measured by different methods for the chlorophyll a and the chlorophyll b are not statistically different.

Key words: microalgae, absorption spectra, chlorophyll

Одна из важных задач биотехнологии это количественное определение пигментов микроводорослей. В настоящее время разработан ряд методов определения качественного и количественного состава пигментов. Молекулярная спектроскопия остается одной из наиболее доступных и универсальных методик количественного определения пигментов. [1].

Наиболее часто используемый спектрометрический метод определения концентрации хлорофиллов и каротиноидов в ацетоновых экстрактах – метод линейных уравнений [2]. Для расчета концентрации используются значения оптических плотностей на длинах волн максимумов поглощения отдельных пигментов.

Однако вопрос определения концентраций пигментов по спектру поглощения нативной культуры микроводорослей остается открытым. Одним из решений данной проблемы является разделение спектра поглощения на отдельные кривые Гаусса [3].

Пигментный состав *Dunaliella salina* представлен следующими пигментами: хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, β-каротин, лютеин, виолаксантин, неоксантин [4]. В длинноволновой области поглощение приходится на хлорофилл *a* и *b*, каротиноиды не вносят вклад в спектр поглощения в данной области [5]. Именно поэтому для исследований была выбрана область 580-750 нм.

Материал и методы исследований.

Объект исследования – спектры поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina* Teod.

Культуру *D. salina*, (штамм IBSS-1) из коллекции культур ИМБИ РАН, выращивали на модифицированной питательной среде Тренкеншу [6] в накопительном режиме, освещенность поверхности культиватора – 80 Вт/м², температура – 26–28°C, pH среды – 6–7. Культура постоянно снабжалась газо-воздушной смесью с 3% содержанием углекислого газа.

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%). Спектры поглощения регистрировались в диапазон от 400 до 800 нм., в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Спектры нативных культур регистрировались на спектрофотометре Specord UV VIS «Carl Zeiss Jena». Спектры ацетоновых экстрактов и фиксировались на спектрофотометре СФ-2000.

Расчет концентраций пигментов в ацетоновых экстрактах проводили по линейным уравнениям со значениями оптической плотности на 470, 646 и 663 нм [2].

Параллельно для анализа спектров поглощения культуры *Dunaliella salina* использовался метод разделения длинноволновой области спектра (от 580 до 750) на отдельные кривые Гаусса. Длинноволновая область спектра была разделена на 5 кривых Гаусса. Начальные параметры аппроксимации и количество кривых было задано исходя из анализа литературных данных по нативным спектрам поглощения чистых пигментов [5]. Для хлорофилла *a* пики 680 и 630 нм, для хлорофилла *b* - 660 нм, общий пик хлорофиллов – 580 нм, и пик в области 700 нм, выбранное количество пиков согласуется с литературными данными [3].

Результаты и обсуждение

В результате анализа 48 спектров поглощения культуры, проведено их разделение моделью из 5 кривых Гаусса:

$$D(\lambda) = \sum_{i=1}^5 a_i \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\lambda - \lambda_{\max i}}{\sigma_i}\right)^2\right) + D_0,$$

где λ – длина волны, нм;

a_i – амплитуда пика, отн.ед.;

σ_i – полуширина пика, нм;

$\lambda_{\max i}$ – положение максимума пика, нм;

D_0 – базовая линия (нулевая линия).

Аппроксимация проводилась методом доверительных областей с заданными ограничениями и начальными параметрами. Коэффициент детерминации R^2 составлял от 0,9956 до 0,9984. Пример разделения спектра представлен на рисунке 1. Усредненные результаты аппроксимации приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Средние параметры разделения спектров поглощения культуры *D. salina*.

Номер пика	1	2	3	4	5
Максимум пика, нм	582,6	630,4	665,0	682,3	702,3
Полуширина пика, нм	22,85	19,53	12,43	9,34	17,02

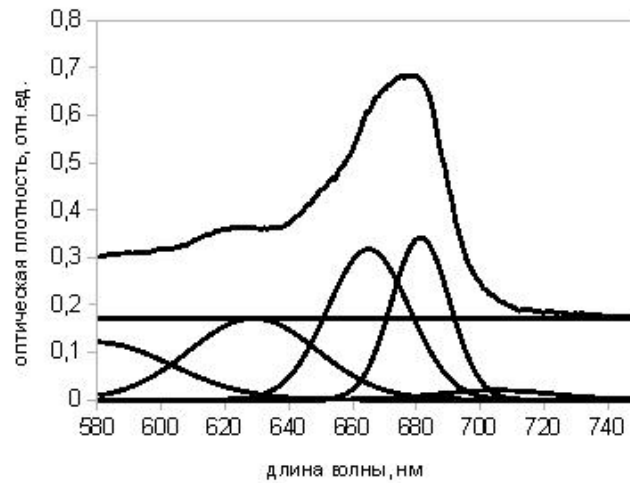


Рисунок 1 – Пример разделения спектра поглощения культуры *Dunaliella salina*

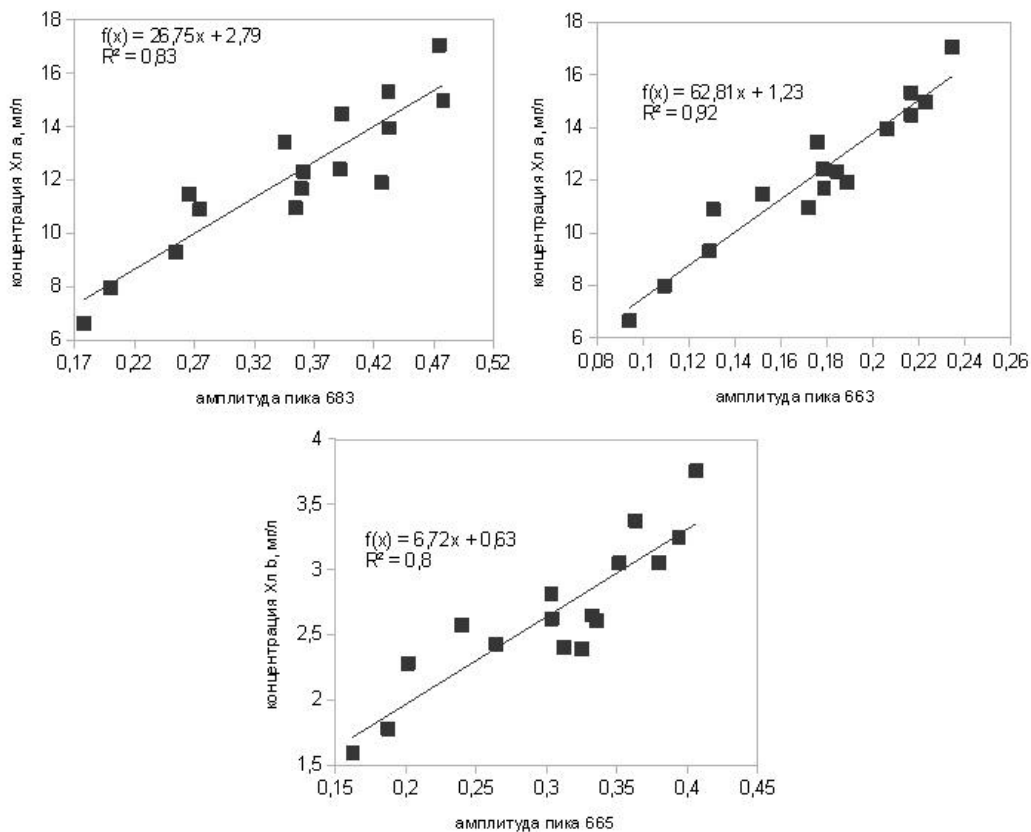


Рисунок 2 – Зависимость оптических плотностей отдельных пиков от концентрации пигментов.

Выявлена зависимость между амплитудами отдельных пиков и концентрациями пигментов (см. рис. 2). Коэффициент R^2 для концентрации хлорофилла a и амплитуд пика 682 составил 0,8263, для концентрации хлорофилла a и амплитуд пика 633 – 0,9168. Для хлорофилла b и амплитуд пика 665 – 0,8009, что говорит о значительной зависимости амплитуды пика от концентрации.

Установлено среднее соотношение между амплитудами пиков, относящимися к хлорофиллу a ($a_{630}/a_{682} = 0,5019$), рассчитаны коэффициенты экстинкции, составлена модель спектра поглощения. В модель внесены поправочные коэффициенты [7]

$$D(\lambda) = D_0 + a_{583} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\lambda - w - 582.6}{22.85 \cdot p}\right)^2\right) + a_{702} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\lambda - w - 702.3}{17.02 \cdot p}\right)^2\right) +$$

$$C_{Chl a} \cdot 0.0285 \cdot \left(\exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\lambda - w - 682.3}{9.34 \cdot p}\right)^2\right) + 0.5019 \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\lambda - w - 630.4}{19.53 \cdot p}\right)^2\right) \right) +$$

$$C_{Chl b} \cdot 0.1143 \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\lambda - w - 665.0}{12.43 \cdot p}\right)^2\right)$$

где $D(\lambda)$ – оптическая плотность;

λ – длина волны, нм;

D_0 – базовая линия (нулевая линия);

$C_{Chl a}$ – концентрация хлорофилла a (мг/л);

$C_{Chl b}$ – концентрация хлорофилла b (мг/л);

w – сдвиг максимума пика, нм;

p – коэффициент изменения полуширины пика .

Получены парные значения ($n = 16$) концентраций хлорофиллов, определенные разными методами (модель нативного спектра и стандартная методика определения пигментов в экстрактах [2]) (см. рис. 3).

Значения концентраций хлорофиллов, определенные разными методами, в значительной мере сходны (коэффициент корреляции составил 0,8369 для хлорофилла a и 0,729 для хлорофилла b).

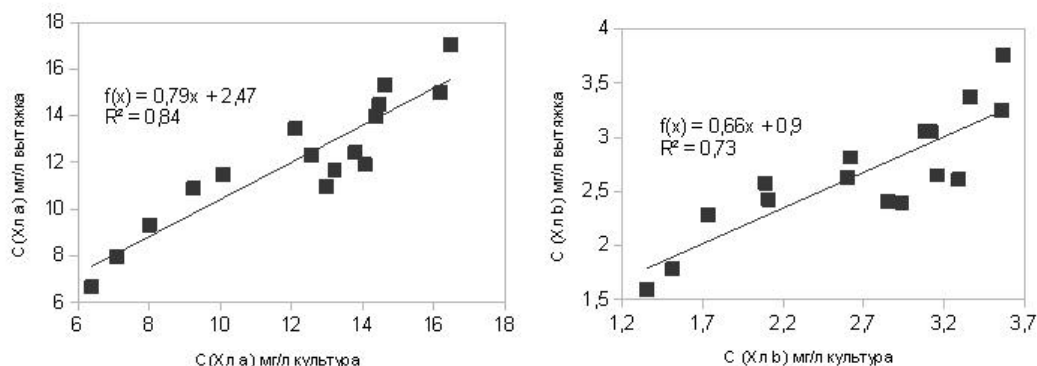


Рисунок 3 – Зависимость между концентрациями пигментов рассчитанными в культуре (модель) и в вытяжке (стандартная методика)

Статистическое отличие от нуля разности значений двух методов измерений проверялось одновыборочным t -критерием. Данные полученные разными методами по хлорофиллу a ($p=0,8767, p>0,05$) и хлорофиллу b ($p=0,8474, p>0,05$), статистически не различаются.

Для сравнения результатов измерений полученных различными методами был применен метод Блэнда-Алтмана [8]. (рисунок 3). Установлено, что все концентрации хлорофиллов находятся в пределах двух стандартных отклонений разности концентраций, что говорит о согласованности измерений полученных двумя способами. Средняя разность методов с 95% доверительным интервалом для хлорофилла a составила 0,051 мг/л [-2,560; +2,459], хлорофилла b 0,019 мг/л [-0,763; +0,726].

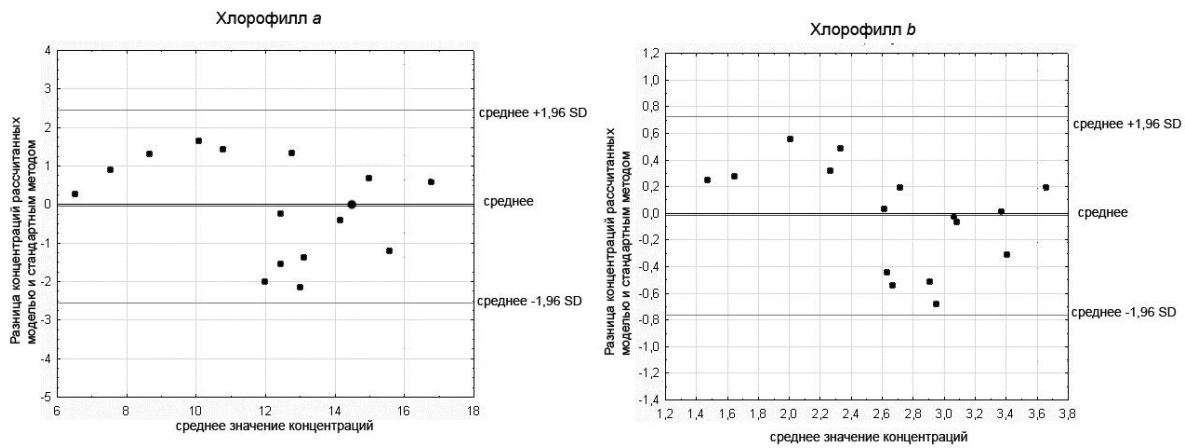


Рисунок 4 – Диаграммы Блэнда-Алтмана, сравнения значений концентраций рассчитанных стандартным методом и моделью

Список литературы / References:

1. Геворгиз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры. *Экол. моря*, 2005, № 70, с. 96-106. [Gevorgiz R.G., Alisievich A.V., Shmatok M.G. Estimation of biomass *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. on the optical density of the culture. *Ecol. seas*, 2005, no. 70, pp. 96-106. (In Russ.)]
2. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 1994, vol. 144, no. 3, pp. 307-313.
3. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, pp. 11-23.
4. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod и перспективы его практического использования*. К.: Наук. думка, 1973, 244 с. [Masjuk N.P. *Morphology, systematics, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod and perspectives of its practical use*. Kiev: Naukova Dumka, 1973, 244 p. (In Russ.)]
5. Bidigare R.R. [et al.] In-vivo absorption properties of algal pigments. Orlando'90, 16-20 April. *International Society for Optics and Photonics*, 1990, pp. 290-302.
6. Тренкеншу Р.П. *Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 1984, 28 с. [Trenkenshu R.P. *Growth and photovoltaic characteristics of marine microalgae in a dense culture*: Author. dis. ... cand. biol. Sciences. Krasnoyarsk, 1984, 28 p. (In Russ.)]
7. Küpper 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. *Analytical chemistry*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
8. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet*, 1986, vol. 327, no. 8476, pp. 307-310.

ФОРМИРОВАНИЕ ДИССИПАТИВНЫХ СТРУКТУР ВДАЛИ ОТ ГРАНИЦЫ ПОТЕРИ РАВНОВЕСИЯ ПРОСТРАНСТВЕННО ОДНОРОДНЫМИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯМИ ПЛОТНОСТЕЙ В СИСТЕМАХ ТИПА ХИЩНИК — ЖЕРТВА

Губарев А.А.

Донецкий национальный университет
ул. Университетская, 24, г. Донецк, 83001, Украина
e-mail: Gubarev_A_A_@mail.ru

Аннотация. Для двух распределённых моделей хищник — жертва численно построены стационарные диссипативные структуры, формирующиеся вдали бифуркации Тьюринга. В случае кругового ареала в области параметров, где при малой амплитуде наибольшую скорость роста имеет возмущение, независимое от полярного угла, в одной из моделей наблюдается последовательность расщепления максимума плотностей. В аналогичном случае в другой модели (с нижней критической плотностью жертв) наблюдается формирование контактных структур близких к полосам.

Ключевые слова: хищник — жертва, диссипативные структуры