

## ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Гаврилов П.Е.<sup>1</sup>, Лелеков А.С.<sup>2</sup>, Малахов А.С.<sup>3</sup>, Умеров Э.Э.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: havrilovpyotr@gmail.com

<sup>2</sup> Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: mac89@mail.ru

Поступила в редакцию: 27.07.2018.

**Аннотация.** В работе предложен новый экспресс-метод определения спектра поглощения микроводорослей на основе записи спектра излучения источника света до и после прохождения через культуру с использованием свободного программного обеспечения SpectralWorkbench. Изготовлен самодельный спектрометр, который представлял собой напечатанную на 3D принтере ANET A6 из ABS пластика модель черного цвета с дифракционной решеткой с разрешающей способностью  $d = 0,74$  мкм. Программный макет спектрометра выполнен в онлайн-редакторе Tinkercad. Полученный со спектрометра оптический спектр источника света переводился в графическую или табличную зависимость относительной мощности излучения от длины волны при помощи SpectralWorkbench. В качестве апробации спектрометра записаны спектры излучения люминесцентной лампы Philips TL-D 18/W 54 с использованием различных видеокамер. Показано, что качество спектра излучения определяется разрешающей способностью используемой камеры. Для определения спектра пропускания культуры микроводорослей было найдено отношение проходящей через фотобиореактор интенсивности света к падающей для каждой длины волны. Оптическая плотность была определена на основе закона Бугера-Ламберта-Бера. Полученный спектр поглощения культуры *S. platensis* характеризуется наличием максимумов всех фотосинтетических пигментов. Сравнение полученных результатов со спектрами поглощения, которые записаны на спектрофотометрах без интегрирующей сферы СФ-2000 и Unico-4802, показало преимущество предлагаемого подхода.

**Ключевые слова:** спектрометр, программное обеспечение SpectralWorkbench, моделирование, *Spirulina platensis*.

Спектр поглощения культуры низших фотоавтотрофов является ключевой характеристикой пигментного состава клеток, который в свою очередь определяется внешними световыми условиями. По спектру возможно определить количество хлорофиллов и каротиноидов в клетках микроводорослей или цианобактерий при помощи его моделирования кривыми Гаусса. Такой подход значительно упрощает определение пигментного состава клеток, который обычно основан на спектрометрии ацетоновых экстрактов [1]. Кроме того, для многих видов микроводорослей наблюдается пропорциональность количества хлорофилла *a* и структурных клеточных компонентов, например, белков [2]. Это позволяет при помощи математического моделирования по спектру поглощения культуры микроводорослей определять её биохимический состав.

На сегодняшний день запись нативного спектра поглощения культуры микроводорослей осложняется сильным влиянием светорассеяния. Поэтому любой спектрофотометр без интегрирующей сферы непригоден для этих целей. Даже в случае наличия интегрирующей сферы вследствие оседания либо "всплывания" клеток микроводорослей в опытной кювете при записи спектра поглощения могут возникать значительные ошибки. Таким образом, разработка принципиально нового подхода к записи спектра поглощения культуры микроводорослей на сегодняшний день является актуальной проблемой, решение которой находится на стыке биологии, физики, приборостроения.

Целью данной работы являлась разработка экспресс-метода получения спектра поглощения культуры микроводорослей на основе свободного программного обеспечения SpectralWorkbench.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была выбрана *Spirulina (Arthrospira) platensis*, полученная из коллекции Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь. *S. platensis* выращивали в унифицированной лабораторной установке [3] на питательной среде Заррук. Культура *S. platensis* выращивалась в 1 см фотобиореакторе, в качестве источника света использовалась световая решётка из 5 теплых (4100 К) и 5 холодных (6500 К) люминесцентных ламп Philips TL-D 18/W 54. Толщина фотобиореактора в 1 см была подобрана исходя из стандартной толщины кюветы во многих спектрофотометрах. Контрольные спектры поглощения культуры регистрировали с помощью двулучевого спектрофотометра ЮНИКО-4802 и однолучевого СФ-2000. Для определения контрольного спектра излучения люминесцентных ламп использовали спектроколориметр ТКА-ВД/02 и программное обеспечение "Спектрофотометр". Опытные спектры излучения

люминесцентных ламп регистрировали при помощи самодельного спектрометра и программного обеспечения SpectralWorkBench (<https://spectralworkbench.org>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрометр представлял собой напечатанную на 3D принтере ANET A6 из ABS пластика модель черного цвета, прототипом которой послужил такой же спектрометр, изготовленный из картона (<https://spectralworkbench.org>). В качестве дифракционной решетки использовалась часть DVD диска с разрешающей способностью  $d = 0,74$  мкм. Конструкция спектрометра позволяла менять дифракционную решетку. В качестве входного отверстия использовалась регулируемая щель, которая обеспечивала точную регулировку количества проходящего в спектрометр света. Для уменьшения отражения света внутренние стенки были покрыты черным бархатом. На рисунке 1 представлен программный макет, выполненный в онлайн-редакторе Tinkercad (<http://tinkercad.com>), внешний вид спектрометра, а также получаемый на спектрометре оптический спектр люминесцентной лампы. Отметим ярко выраженные максимумы в виде вертикальных полос в синей и зелёной области.

Полученное со спектрометра изображение обрабатывалось при помощи свободного программного обеспечения SpectralWorkBench. Программа позволяет перевести полученный после дифракционной решетки оптический спектр в графическую или табличную зависимость относительной мощности излучения от длины волны. Программа может обрабатывать фотографии, загруженные с любой камеры или фотоаппарата, а также позволяет подключать камеру и записывать спектры в режиме реального времени.

Недостатком такого подхода является то, что большое значение при получении спектра источника света имеет применяемая камера или фотоаппарат. Наилучшим вариантом является использование HD-камеры, которая может подключаться к ПК и позволяет получать спектры онлайн.

Для примера на рисунке 2 представлены спектры излучения холодной люминесцентной лампы Philips TL-D 18/W 54, записанные с помощью камеры смартфона Xiaomi Redmi 4x, стандартной веб-камеры A4TECH PK-710MJ, HD камеры ноутбука Lenovo Z510 и контрольный спектр со спектроколориметра ТКА-ВД/02. Как следует из рисунка, все спектры отличаются друг от друга, и порою не имеют ничего общего с контрольным спектром. Это связано с различиями в устройстве светочувствительной матрицы, которая регистрирует и переводит изображение в цифровой формат. Максимальное соответствие с контрольным спектром получено для HD камеры ноутбука Lenovo Z510.

Для достижения поставленной цели необходимо записать спектр лампы до и после прохождения через культуру микроводорослей. На рисунке 3 представлены спектры излучения используемой в эксперименте световой решетки, полученные на опытном спектрометре SpectralWorkBench с HD камерой ноутбука Lenovo Z510. Спектр записан в момент окончания экспоненциальной фазы роста, после прохождения света через 1 см слой культуры *S. platensis*. И опытным и в контрольном варианте результаты были идентичны.

Для определения спектра пропускания культуры необходимо найти отношение проходящей интенсивности света к падающей для каждой длины волны. Так как спектры представлены в относительных величинах (относительно максимального значения интенсивности на одной из длин волн), для расчёта пропускания необходимо найти распределение по энергии. Для этого просуммируем все  $i$ -ые величины относительной интенсивности, далее каждую из них разделим на полученную сумму. Коэффициент пропускания для каждой длины волны  $i$  теперь можно определить по формуле:

$$T_i = \frac{\delta_i}{\Delta_i} \cdot \frac{\sum_i \delta_i}{\sum_i \Delta_i},$$

где  $\delta_i$  – доля энергии после прохождения света через культуру;  $\Delta_i$  – доля энергии до прохождения света через культуру.

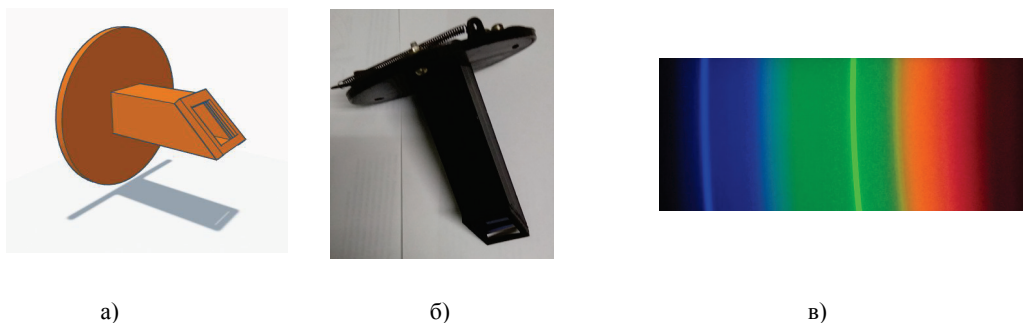
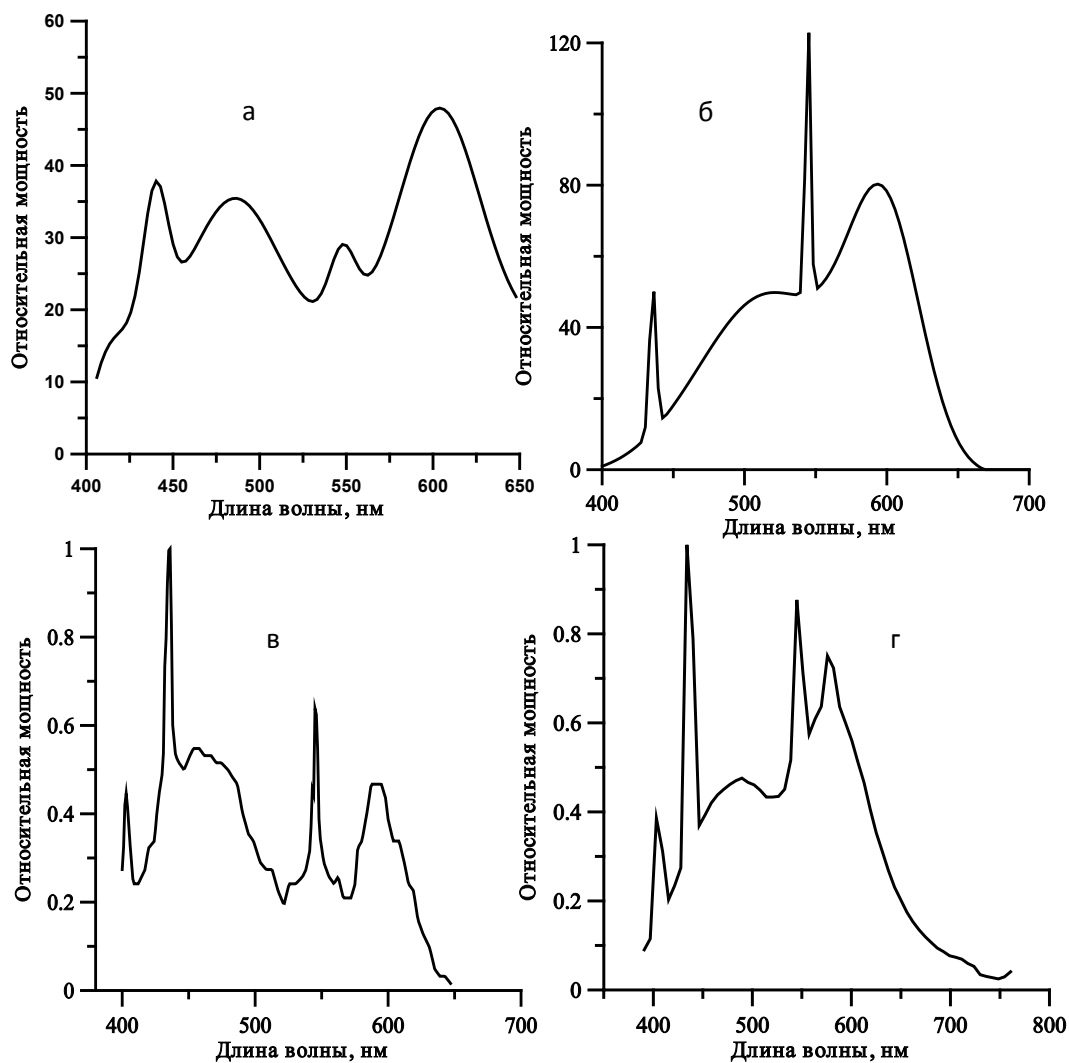
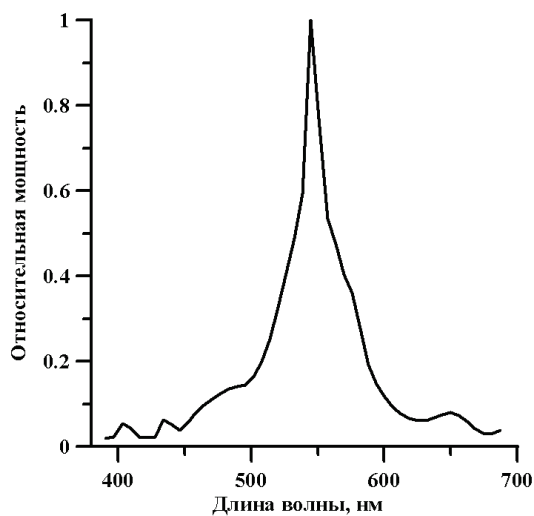


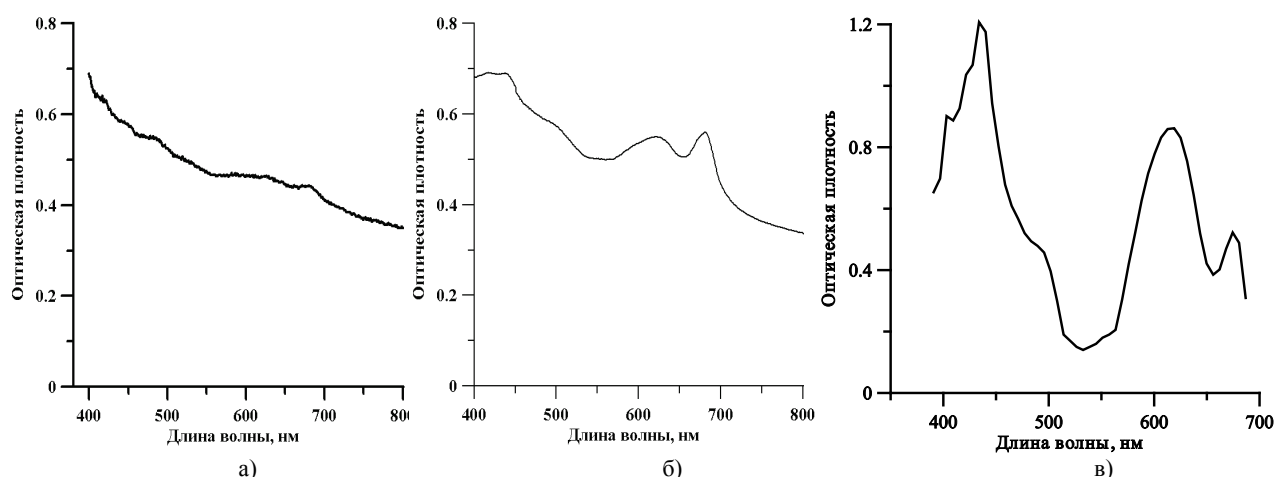
Рисунок 1. Программный макет (а), внешний вид (б) спектрометра и пример получаемого оптического спектра (в)



**Рисунок 2.** Спектры излучения холодной люминесцентной лампы Philips TL-D 18/W 54, записанные с помощью (а) – камеры смартфона Xiaomi Redmi 4x; (б) – стандартной веб-камера A4TECH PK-710MJ; (в) – HD видеокамеры ноутбука Lenovo Z510; (г) – спектроколориметра ТКА-ВД/02



**Рисунок 3.** Спектр излучения комбинации теплых и холодных люминесцентных ламп после прохождения через 1 см фотобиореактор с культурой *S. platensis*



**Рисунок 4.** Спектр поглощения культуры *S. platensis*. (а) – СФ-2000; (б) – Unico-4802; (в) – спектрометр SpectralWorkBench

Для нахождения величины оптической плотности воспользуемся законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$D_i = -\lg T_i.$$

Полученный спектр поглощения культуры *S. platensis* представлен на рисунке 4в. Для сравнения приведены спектры поглощения *S. platensis* на спектрофотометрах без интегрирующей сферы СФ-2000 (рис. 4а) и Unico-4802 (рис. 4б). Полученный спектр поглощения *S. platensis* близок к типовому [4] и характеризуется наличием максимумов всех фотосинтетических пигментов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена разработке простого и доступного способа определения спектра поглощения культуры микроводорослей на основе записи спектра света до и после прохождения через слой культуры с использованием свободного программного обеспечения SpectralWorkBench. Предлагаемый способ позволяет получить спектр поглощения в режиме реального времени при соответствующей программной поддержке, без отбора пробы из фотобиореактора, т. е. без вмешательства экспериментатора в рост культуры. В дальнейшем при использовании математического моделирования по спектру возможно получать данные о динамике основных биохимических составляющих клеток микроводорослей. Кроме того, для записи спектра не требуется дорогостоящее оборудование, а применяемый в данной работе спектрометр может быть изготовлен из подручных материалов. Единственным требованием к спектрометру является наличие качественной видеокамеры высокого разрешения.

*Работа выполнена в рамках госзадания по НИР «Разработка научных основ решения гидробиологических и биотехнологических проблем интегрированного управления прибрежными зонами» № АААА-А18-118021350003-б и частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-44-920009 р\_а.*

### Список литературы / References:

1. Чернышев Д.Н., Боровков А.Б. Разделение спектра поглощения культуры *Dunaliella salina* в области 580-750 нм. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, с. 124-128, URL: <https://www.sevsu.ru/images/nauka/pechat/2017/BPPC-2017.pdf>. [Chernyshev D.N., Borovkov A.B. Separation of absorption spectrum of *Dunaliella salina* culture in the region of 580-750 nm. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2017, vol. 2, p. 124-128, URL: <https://www.sevsu.ru/images/nauka/pechat/2017/BPPC-2017.pdf>. (In Russ.)]
2. 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. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2018, vol. 3, no. 1, p. 53-60, DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06. (In Russ.)]
3. 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>. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified setup for laboratory studies of microalgae. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2017, № 1 (13), URL: <http://algology.ru/1097>. (In Russ.)]
4. Геворгиз Р.Г., Малахов А.С. *Пересчёт величины освещённости фотобиореактора в величину облучённости: учеб.-метод. пособие*. Севастополь: ООО «Колорит», 2018, 60 с., DOI: 10.21072/978-5-6041191-4-3. [Gevorgiz R.G., Malakhov A.S. Conversion of the illumination quantity of photobioreactor into the irradiance quantity:

educational methodology manual. Sevastopol: OOO «Colorit», 2018, 60 p., DOI: 10.21072/978-5-6041191-4-3. (In Russ.)]

## RAPID METHOD FOR DETERMINING THE ABSORPTION SPECTRUM OF MICROALGAE CULTURE

Gavrilov P.E.<sup>1</sup>, Lelekov A.S.<sup>2</sup>, Malakhov A.S.<sup>3</sup>, Umerov E.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sevastopol State University

*Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: havrilovpyotr@gmail.com*

<sup>2</sup> Institute of Marine Biological Research A.O. Kovalevsky

*Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru*

<sup>3</sup> National research Tomsk Polytechnic University

*Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: mac89@mail.ru*

**Abstract.** A new rapid method for determining the absorption spectrum of microalgae culture is proposed. The method based on the recording the emission spectrum of the light source before and after passing through the culture and using SpectralWorkbench free software. A home-made spectrometer in the form of a black model made of ABS plastic on a 3D printer ANET A6 with a diffraction grating with a resolving power of  $d = 0.74 \mu\text{m}$  was produced. The software layout of the spectrometer was made in the online editor Tinkercad. The optical spectrum of the light source obtained from the spectrometer was converted into a graphical or tabular dependence of the relative power of radiation on the wavelength using SpectralWorkbench. Test run of the spectrometer includes the recordings of the radiation spectrum of the fluorescent lamp Philips TL-D 18 / W 54 using various video cameras. It is shown that the quality of the radiation spectrum determination is assessed by the resolving power of the camera used. To determine the transmission spectrum of the microalgae culture, a ratio of the light intensity passing through the photobioreactor to the incident wavelength was calculated. The optical density was determined on the basis of the Bouguer-Lambert-Beer law. The obtained absorption spectrum of the *S. platensis* culture is characterized by the presence of maxima of all photosynthetic pigments. The drawn comparison between the results and absorption spectra recorded on spectrophotometers without the integrating sphere SF-2000 and Unico-4802 has shown the advantage of the proposed approach.

**Key words:** spectrometer, SpectralWorkbench software, simulation, *Spirulina platensis*.