ИЗМЕРЕНИЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ПЛОТНЫХ КУЛЬТУР БЕНТОСНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Железнова С.Н.[1], Малахов А.С.[2], Геворгиз Р.Г.[1]

[1] ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru
[2]Национальный исследовательский Томский политехнический университет
пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: mac89@mail.ru
Поступила в редакцию: 01.08.2019

Аннотация. В работе рассматриваются проблемы измерения спектров поглощения бентосных видов диатомовых водорослей. При измерениях спектров культур бентосных микроводорослей ошибкам, связанным с рассеиванием света, сопутствуют ошибки, связанные с оседанием клеток. Показано, что использование портативных спектрофотометров при ориентации оптического пути в вертикальном положении скорость оседания бентосных водорослей не влияет на измерение спектров поглощения в области ФАР. Сообщается о необходимости учитывать спектры флюоресценции культуры из–за наличия большой доли флюоресценции в красной области.
Ключевые слова: *микроводоросли, бентосные диатомовые водоросли, диатомовая водоросль Cylindrotheca closterium*

Спектральные характеристики культур микроводорослей являются ключевым параметром в исследованиях фотосинтеза, продукционных характеристик, при решении экологических задач, а также для разработки новых биотехнологий на основе микроводорослей [1-5]. Для измерения спектра поглощения растворов обычно используются стационарные спектрофотометры, которые позволяют получать результат измерений с высокой степенью точности. Поскольку клетки микроводорослей обладают чрезвычайной гетерогенностью при измерении спектров поглощения плотных культур существенную роль играет не только поглощение, но и рассеивание света [1]. Для исключения процессов, связанных с рассеиванием света суспензией клеток, используют спектрофотометры с интегрирующей сферой. Данные приборы достаточно дороги, поэтому не всегда доступны для исследователя. Среди альгологов, исследующих культуры микроводорослей наибольшую распространенность получили спектрофотометры без интегрирующей сферы, разработанные для не рассеивающих свет растворов. При измерении спектров поглощения культур микроводорослей на таких приборах рассеванием света пренебрегают.

Особые трудности у исследователей возникают при измерении спектров поглощения бентосных видов микроводорослей [4]. Клетки бентосных микроводорослей характеризуются удельной плотностью большей единицы [4], поэтому достаточно быстро оседают на дно кюветы, в связи с чем при длительном измерении проб (0,5-5 мин) на спектрофотометре получаются заведомо искаженные спектры поглощения. Таким образом, при измерениях спектров культур бентосных микроводорослей ошибкам, связанным с рассеиванием света сопутствуют ошибки, связанные с оседанием клеток. Наибольшие искажения спектров наблюдается для спектрофотометров, у которых луч света при измерении распространяется горизонтально, поэтому такие приборы для исследований плотных бентосных культур практически непригодны.

В последнее десятилетия с развитием элементной базы появились портативные спектрофотометры, особенностью которых является возможность проводить измерения мощности и спектрального состава светового потока в любом направлении от источника излучения. Использование такого класса приборов позволяет проводить измерения с вертикальной ориентацией оптического пути, что исключает ошибки, связанные с оседанием клеток.

Цель работы – разработать методику измерения спектров поглощения плотных культур бентосных микроводорослей в области ФАР, используя портативный спектрофотометр.

МАТЕРАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали бентосную диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium*. Культуру, полученную из музея адаптировали к питательной среде RS на люминостате при постоянной температуре 15-18°С и круглосуточном освещении. Питательную среду готовили на основе стерильной черноморской воды. Адаптированную культуру использовали в качестве инокулята для накопительного и непрерывного культивирования *C. closterium* в плоскопараллельном фотобиореакторе с рабочим слоем 5 см. Культуру выращивали в интенсивном режиме при постоянной температуре 19 ± 1°С, при круглосуточном освещении 13,25 клк белыми люминесцентными лампами CЄPIL1LF36W/54-765, спектральные характеристики которых представлены на рисунке 1. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (0,5 л воздуха на 1 л культуры в минуту) посредством компрессорной установки.

Измерение спектра ослабления культуры проводили непосредственно в фотобиореакторе, измеряя интенсивность светового потока и его спектральный состав, прошедшего сквозь культуру. Измерение проводили

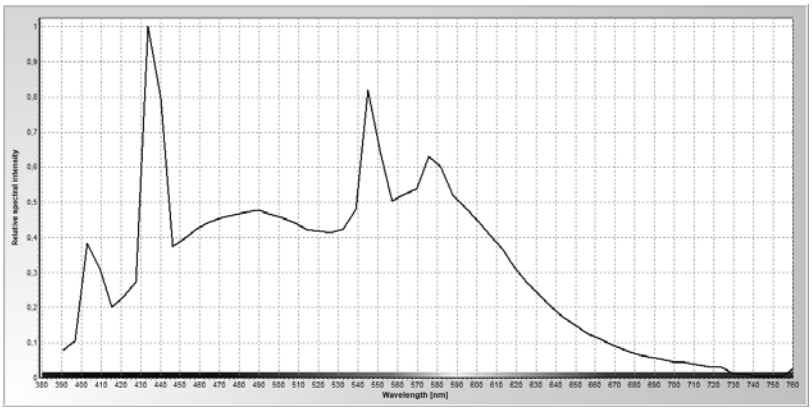

Рисунок 1. Спектр распределения энергии излучения люминесцентной лампы дневного света CЄ PIL 1 LF 36W/54-765, используемой для интенсивного культивирования *C. closterium*

с помощью регистрирующего спектрофотометра ТКА-Спектр(ФАР) при горизонтальном расположение оптического пути. Активный барботаж суспензии исключал оседание клеток на дно фотобиореактора, поэтому воспроизводимость измерений была достаточно высока.

Параллельно измеряли спектр ослабления культуры в химическом стеклянном стакане объемом 1 л с рабочим слоем суспензии 5 см при вертикальном расположении оптического пути. Для исключения процессов рассеяния света стенки стакана снаружи были покрыты титановыми белилами (коэффициент отражения 0,95-0,97).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В работе в использовали культуру бентосной диатомовой водоросли *C.closterium*, клетки которой без перемешивания оседают на дно достаточно быстро. В течение 0,5-1,5 мин коэффициент поглощения надосадочной жидкости близок к нулю, т.е. у *C.closterium* удельная плотность клеток заведомо больше единицы. Из-за оседания клеток спектры культуры на спектроотометре с горизонтально расположенным оптическим путём получить практически невозможно. По нашим данным к концу измерений на таких спектрофотометрах как СФ2000 и Specord UV-VIS практически вся биомасса оседлала на дно кюветы.

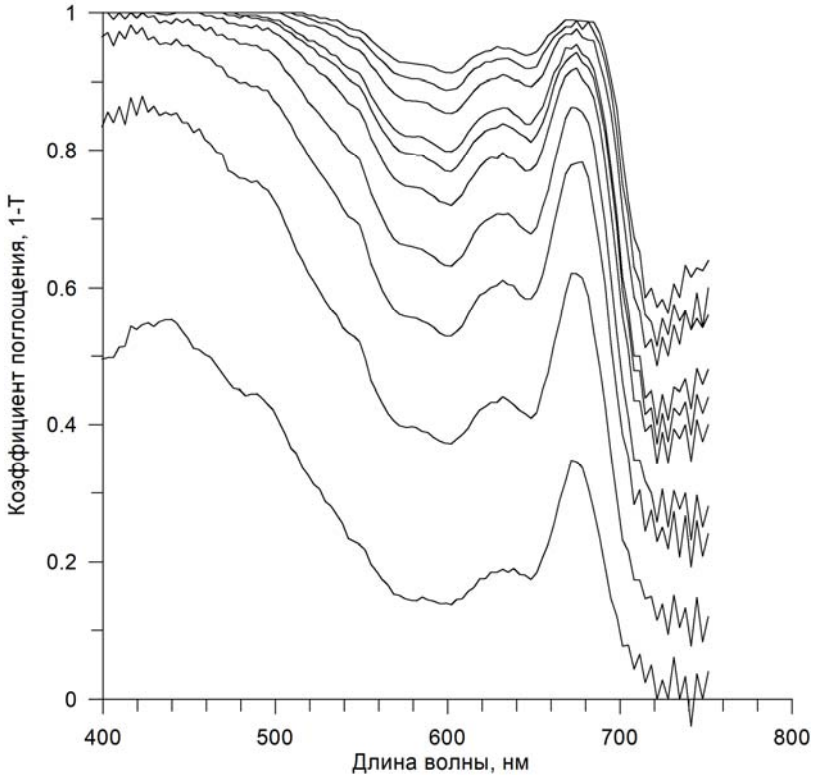

Рисунок 2. Спектр поглощения различных слоев (1-10 см) культуры *C. closterium* в химическом стакане с отражающими боковыми поверхностями при ориентации оптического пути вертикально

При вертикальном расположении оптического пути оседание клеток уже не оказывало существенного влияния на спектр культуры. Измерения спектров поглощения разных слоёв суспензии клеток *C.closterium* в химическом стакане с отражающими боковыми поверхностями представлены на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что в области ФАР спектры получены без заметных искажений. За пределами 710 нм наблюдается значительный разброс данных, причиной которого, по-видимому, является интенсивная флюоресценция фотосинтетического аппарата. Таким образом, использование портативных спектрофотометров позволяет получать спектры культур бентосных видов микроводорослей.

Спектр поглощения культуры микроводорослей наиболее важен в расчетах КПД фотобиосинтеза. Обычно его получают с помощью стационарных спектрофотометров в кювете 1 см, но исследования, как правило, проводят в фотобиореакторах с рабочим слоем 2-10 см, в связи с чем поглощение рабочим слоем световой энергии экстраполируется на основе данных, полученных в 1 см кювете. Подобные расчеты неизбежно сопровождаются ошибками. В отличие от стационарных спектрофотометров портативные спектрофотометры позволяет получать спектры культур микроводорослей непосредственно при интенсивном культивировании клеток в фотобиореакторе. Для этой цели достаточно измерить световой поток, проходящий сквозь культуру. На рисунке 3 представлены спектры поглощения 5 см культуры *C. closterium*, полученные непосредственно в фотобиореакторе и в химическом стакане с отражающими боковыми поверхностями. Из рисунка 3 видно, что спектры достаточно близки. Небольшие различия можно объяснить рассеиванием света через боковые поверхности плоскопараллельного фотобиореактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектр поглощения культуры микроводорослей наиболее важен в расчетах КПД фотобиосинтеза и ошибки в измерениях спектров поглощения крайне недопустимы. Показаны существующие проблемы при измерении спектров поглощения плотных культур бентосных микроводорослей в области ФАР и предложены пути их решения.

Во-первых, при ориентации оптического пути в вертикальном положении скорость оседания бентосных водорослей перестает влиять на измерение спектров поглощения в области ФАР. Во-вторых, из – за большой доли флюоресценции культуры в красной области для точного анализа спектров поглощения необходимо учитывать спектры флюоресценции культуры.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ госрегистрации АААА-А18-118021350003-6) при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00672.

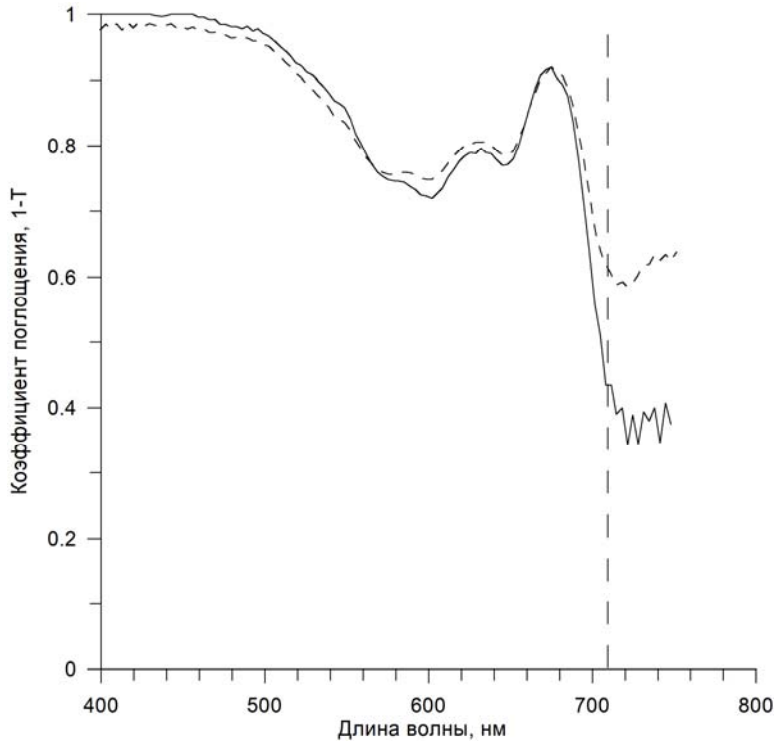

Рисунок 3. Спектр поглощения культуры *C. closterium.* Сплошная линия – поглощение 5 см суспензии в стакане с отражающими боковыми поверхностями. Оптический путь расположен вертикально. Пунктирная линия – поглощение суспензии в плоскопараллельном фотобиореакторе с рабочим слоем 5 см. Оптический путь расположен горизонтально

Список литературы / References:

1. Sánchez-Saavedra M.P., Voltolina D. Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*, 2002, vol. 28, iss. 3, pp. 273-279.

2. Sánchez-Saavedra M.P., Voltolina D. Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 1996, vol. 8, iss.2, pp. 131-137.

3. Aidar E., Gianesellagalvao S.M.F., Sigaud T.C.S., Asano C.S., Liang T.H., Rezende K.R.V., Oishi M.K., Aranha F.J., Milani G.M., Sandes M.A.L. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photosynthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1994, vol. 180, iss 2, pp. 175-187.

4. Mercado J.M., Sanchez-Saavedra M.D., Correa-Reyes G., Lubian L., Montero O., Figueroa F.L. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 2004, vol. 78, iss. 3, 265-277.

5. Mohsenpour S.F., Richards B., Willoughby N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology*, 2012, vol. 125, pp. 75-81. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.072.

6. Schellenberger Costa B., Jungandreas A, Jakob T., Weisheit W., Mittag M., Wilhelm C. Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum. Journal of Experimental Botany*, 2013, vol. 64, iss. 2, pp. 483-493. DOI: 10.1093/jxb/ers340.

MEASUREMENT OF ABSORPTION SPECTRUM OF DENSE CULTURES OF BENTHIC MICROALGAE

Zheleznova S.N.[1], Malakhov A.S.[2], Gevorgiz R.G.[1]

[1] A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

[2] National research Tomsk Polytechnic University

Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia

Abstract. In this paper, the problems in measuring the absorption spectra of benthic diatom were considered.When measuring the spectra of cultures of benthic microalgae, there are errors associated with light scattering and associated with the subsidence of cells. It is shown that the use of portable spectrophotometers when orienting the optical path in a vertical position does not affect the measurement of absorption spectra in the PAR region. It is reported that it is necessary to take into account the fluorescence spectra of the culture due to the presence of a large proportion of fluorescence in the red region.

Key words: *microalgae, benthic diatoms, diatom Cylindrotheca closterium.*