

## РАЗДЕЛЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ И АЦЕТОНОВОГО ЭКСТРАКТА МИКРОВОДОРОСЛИ *TETRASELMIS VIRIDIS* НА СПЕКТРЫ ОТДЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ

Чернышев Д.Н.<sup>1</sup>, Горбунова С.Ю.<sup>2</sup>, Тренкеншу Р.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Севастопольский государственный университет

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

<sup>2</sup> ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

**Аннотация.** В работе проведено разделение спектра поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* методом GPS на спектры отдельных пигментов. Основными пигментами оказались лютеин, неоксантин хлорофилл *a* и хлорофилл *b*. В спектре культуры с помощью производной второго порядка выявлены отдельные максимумы поглощения. Полученные данные взяты за основу при составлении модели спектра нативных форм пигментов. Предложены модели нативных форм хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, и суммарных фотопротекторных каротиноидов. Полученные математические модели спектров поглощения отдельных пигментов и литературные коэффициенты экстинкции могут быть использованы для быстрого расчета концентраций пигментов в культуре.

**Ключевые слова:** морские микроводоросли, *Tetraselmis viridis*, хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, спектры поглощения, гауссианы.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из методических задач является быстрое и достаточно точное определение пигментного состава микроводорослей.

Разделение физико-химическими методами смеси пигментов на отдельные составляющие часто приводит к искаженным результатам исследований, из-за нарушения системы комплексных межмолекулярных взаимодействий. Изменения в окружении хромофорных групп могут повлечь за собой изменения спектральных характеристик. В частности, сдвиг максимумов поглощения хлорофилла *a* нативной форме и в ацетоновом экстракте. [1]

Одним из решений проблемы является разложение нативного спектра поглощения математическими методами. Данная задача требует разработки способа разложения спектра поглощения культуры на спектры отдельных пигментов.

В настоящей работе нами проанализированы спектральные свойства ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* и нативный спектр поглощения культуры данной микроводоросли.

Целью настоящей работы явилось разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения отдельных пигментов в спектре поглощения культуры, поскольку спектроскопия до сих пор остается одним из наиболее эффективных и доступных методов при анализе свойств пигментов.

Микроводоросль *Tetraselmis viridis* была выбрана в качестве объекта исследования, поскольку содержит хлорофилл *a*, хлорофилл *b* и типичные для отдела *Chlorophyta* фракции каротиноидов. А именно  $\beta$ -каротин, зеоксантин, лютеин и ксантофиллы виолоксантинового ряда (неоксантин и виолоксантин). [2]

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали альгологически чистую культуру *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) [3] – штамм IBSS-25 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН». *Tetraselmis (Platymonas) viridis* Rouch. впервые был описан [4] и выделен в культуру из Чёрного моря.

Питательная среда готовилась на основе нестерильной черноморской воды с солёностью 1,4-1,8 ‰. Состав среды для культивирования *T. viridis* в плотной культуре приведён в работе [5]. С целью обеспечения чистоты эксперимента и предотвращения заражения культуры другими видами микроводорослей уровень солёности в среде доводили до средиземноморского, путём добавления 15 г/л NaCl.

Для получения инокулята, *T. viridis* в течение 5-7 суток выращивали методом накопительной культуры [6], при котором систематического внесения элементов питания в среду не происходит, а плотность микроводорослей увеличивается и достигает максимального значения. Для засева экспериментального культиватора использовали активно делящуюся культуру, взятую на линейной стадии роста, когда её продуктивность максимальна.

*T. viridis* выращивали накопительным методом в стеклянном культиваторе плоскопараллельного типа [7], с рабочим объёмом 3 л при боковом поверхностном освещении 10 кЛк. Освещённость поверхности фотобиореакторов определяли люксметром Ю-116. С целью компенсации испарения воды, на протяжении всего

эксперимента поддерживали этот объём, доливая перед измерениями дистиллированную воду до отметки 3 л. Скорость продувки воздухом через распылители в культуре составляла  $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ . Температура среды автоматически поддерживалась на уровне  $24^\circ\text{C}$ , которую контролировали ртутным термометром непосредственно в культиваторе, абсолютная погрешность измерений составляла  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Для засева экспериментальных культиваторов использовали активно делящуюся культуру, начальная плотность составляла  $0,06 \text{ г/л}$  сухого вещества.

Оптическую плотность рассчитывали по формуле:  $D = -\lg(T)$ , где  $T$  – величина пропускания, определяемая на Unico 2100 (United Products & Instruments, USA) при длине волны  $750 \text{ нм}$ , абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышала  $1,0 \%$ . Параллельно аналогичные измерения производили с помощью прибора КФК 2. Показания плотности на разных приборах не выявили различий, превышающих абсолютную погрешность. При пересчёте единиц оптической плотности на сухой вес микроводорослей (СВ) использовали эмпирически определённый коэффициент  $k$ , равный  $0,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \text{ ед.опт.пл}^{-1}$ ;  $\text{СВ} = k \times D750 \cdot 0,8$  [8]. Определение плотности по сухому весу и подсчёт концентрации клеток в камере Горяева производили в пятикратной повторности по методикам, описанным в работе [9]. Микроскопический контроль культуры производили с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия).

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%) [10]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов фиксировались на спектрофотометре СФ 2000, в диапазоне от  $400$  до  $800 \text{ нм}$ , в кварцевых кюветах с длиной оптического пути  $1 \text{ см}$ . Спектры нативных культур регистрировались на спектрофотометре Lambda 35 с интегрирующей сферой.

Оценку пигментного состава по спектру поглощения ацетонового экстракта проводили по стандартной методике, с использованием линейных уравнений по 3 точкам в спектре поглощения экстракта [11]. Так же оценка пигментного состава была проведена при анализе спектров методом GPS [12].

Математическую обработку и моделирование экспериментальных данных осуществляли с помощью компьютерных программ «Grapher3», «Excel», «SciDAVis», «MagicPlot».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост *T. viridis* контролировали в течение 16 суток. Были рассчитаны основные кинетические характеристики роста культуры, которые представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Кинетические характеристики роста культуры *T. viridis*

Параметр	Числовой показатель
Начальная биомасса, г АСВ/л	0,06
Удельная скорость роста, $\text{сут}^{-1}$ , $R_{\text{sq}}=0,99$	0,43
Продуктивность, г АСВ/л, $R_{\text{sq}}=0,99$	0,12
Максимальное количество клеток в 1 мл	$7,46 \cdot 10^6$
Урожай, г/3л	2,76

За 6 суток выращивания биомасса *T. viridis* увеличилась в двенадцать раз.

Учитывая, что культура росла без дополнительной подачи углерода, полученные значения по продуктивности и удельной скорости роста сопоставимы с данными, представленными в работе [13].

Содержание пигментов было вычислено по спектру поглощения ацетонового экстракта как стандартным методом [11], так и методом GPS [12] суть которого заключается в аппроксимации спектра поглощения суммой моделей пигментов. Однако спектры зеоксантина и  $\beta$ -каротина очень сходны и при анализе спектров методом GPS разделить их невозможно, поэтому они оцениваются вместе [12].

Для анализа спектральных свойств ацетонового экстракта микроводоросли *T. viridis* в математическую модель на первом этапе были заложены следующие пигменты: хлорофилл *a*, хлорофилл *b*,  $\beta$ -каротин, лютеин, неоксантин, виолоксантин.

Разделение показало, что основные каротиноиды это лютеин и неоксантин, которые можно отнести к фотопротекторным каротиноидам.

Так же был проведен анализ нативного спектра поглощения культуры. Из литературы [1, 2] известно, что спектры поглощения нативных форм хлорофиллов и каротиноидов сдвигаются по отношению к ацетоновым экстрактам. Максимум хлорофилла *a* в красной области сдвигается на  $12 \text{ нм}$ , а в синей области на  $8$ . Для хлорофилла *b* сдвиг в красной области составляет  $6 \text{ нм}$ , а в синей  $12 \text{ нм}$ . Для фотопротекторных каротиноидов, в частности  $\beta$ -каротина, сдвиг составляет  $10 \text{ нм}$ .

На рисунке 2 показаны спектры поглощения зелёной водоросли *T. viridis* измеренные *in vitro* и *in vivo*.

Спектры различаются величинами оптической плотности и сдвигом синего и красного максимумов. Кроме сдвига максимумов в нативном спектре, поглощение света меньше, чем в ацетоновом экстракте.

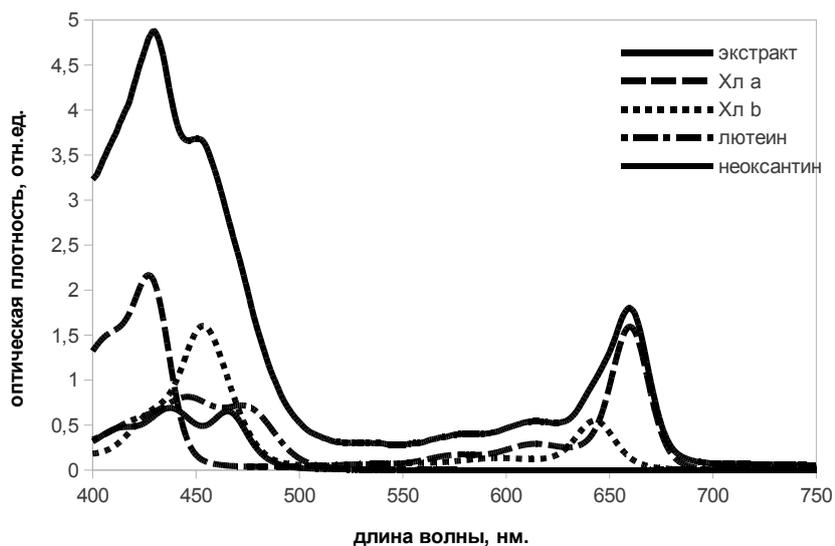


Рисунок 1. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *T. viridis* методом GPS

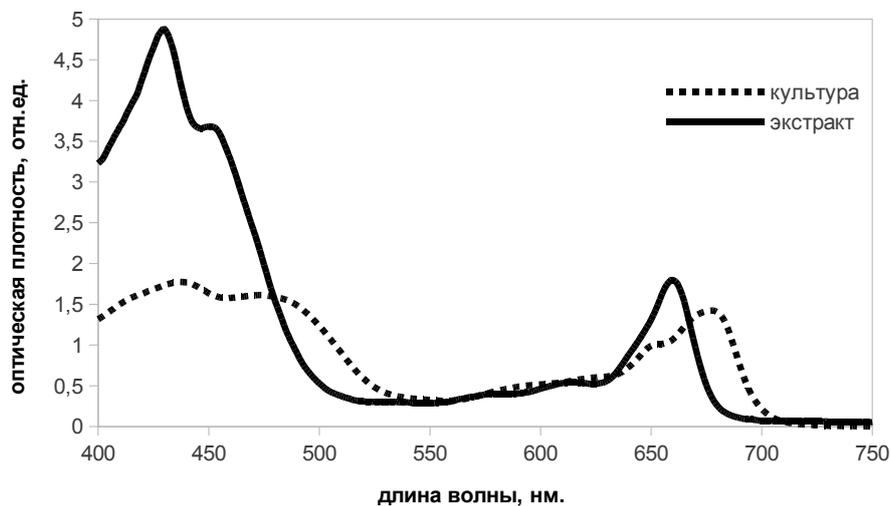


Рисунок 2. Спектры поглощения *T. viridis* in vitro и in vivo пересчитанные в чистом виде (с учетом разбавления) на 1 см оптического пути

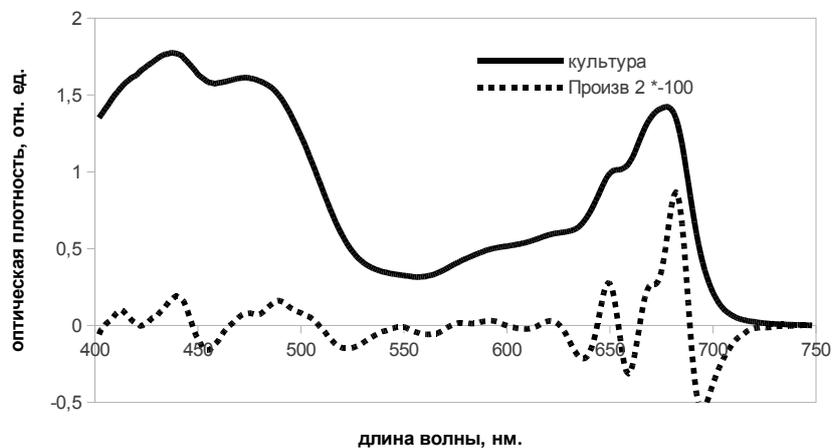


Рисунок 3. Спектр поглощения культуры *T. viridis* и его производная второго порядка ( $\times -100$ )

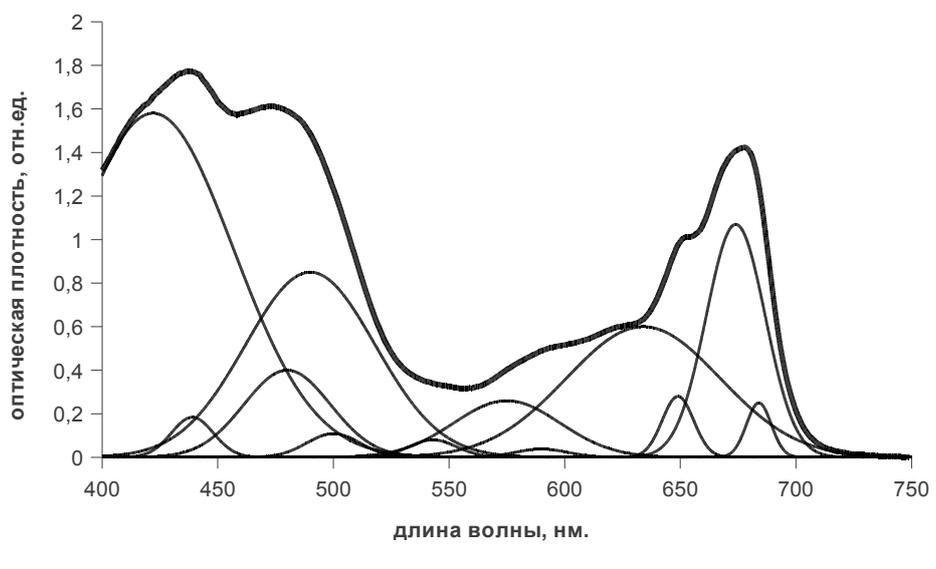


Рисунок 4. Разделение спектра поглощения культуры *T. viridis* на отдельные кривые Гаусса

Уменьшение поглощения света *in vivo* связано с тем, что пигменты, упакованные в клетке, менее эффективно поглощают свет в сравнении с их ацетоновым экстрактом. Это связано с упаковкой пигментов внутри хлоропласта, что приводит к самозатенению пигментов при их высоком внутриклеточном содержании и, как следствие, к уменьшению величин удельных коэффициентов поглощения света [2].

Было проведено разделение нативного спектра поглощения на отдельные кривые Гаусса, а затем соотношение каждой кривой с соответствующим пигментом. Для более точного определения максимумов была использована вторая производная спектра поглощения культуры микроводоросли.

На представленном графике проявляется сложная структура и заметны отдельные узкие полосы. Производная второго порядка позволяет точно выявить максимумы в спектре поглощения. Контур второй производной и других производных чётного порядка похож на исходный спектр, но имеет меньшую ширину [14].

Весь спектр поглощения был описан суммой кривых Гаусса со значениями максимума в пиках второй производной. Каждый пик описан формулой:

$$D(\alpha) = D_{\max} e^{-0.5 \left( \frac{\alpha_i - \alpha_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

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

$\alpha_i$  – длина волны, нм;

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

$D_{\max}$  – амплитуда пика, отн. ед.;

$\sigma$  – полуширина пика, нм.

Полученные данные приведены в таблице 2.

Анализируя литературные данные [1, 15], можно связать пики с конкретными пигментами, а именно:

Хл а — 421.6; 439.4; 574.7; 634.7; 674.7; 683.6;

Хл б — 478.9; 589.6; 649.2

Суммарные каротиноиды: 490,3; 500,0; 543.3

Полученные данные (максимумы, соотношения амплитуд, и полуширины) можно использовать как математическую модель отдельных пигментов. Пример разделения спектра представлен ниже.

Таблица 2. Рассчитанные характеристики отдельных пиков в спектре поглощения культуры

№ пика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Максимум, $\lambda_{\max}$	421,6	439,4	478,9	490,3	500,0	543,3	574,7	589,6	634,2	649,2	674,7	683,6
Амплитуда, $D_{\max}$	1,5767	0,1837	0,4013	0,8447	0,1088	0,0794	0,2578	0,0381	0,5994	0,2803	1,0736	0,2479
Полуширина, $\sigma$	40,8	10,7	21,8	33,0	13,5	12,2	27,4	13,3	38,6	7,8	14,9	6,3

Известно, что при смещении полосы поглощения хлорофилла, коэффициент экстинкции примерно одинаков в ацетоновом растворе и водном экстракте в красной области [16]. Таким образом, можно использовать максимумы разделенных пигментов, для расчета концентрации используя стандартные значения экстинкции. [17].

Ниже предложена модель для аппроксимации спектра поглощения культуры. В данной модели 3 неизвестных величины – концентрации хлорофилла а, хлорофилла b, и концентрация суммарных каротиноидов.

$$D(\lambda) = D_{X_{la}}(\lambda) + D_{X_{lb}}(\lambda) + D_{\text{сум.кар.}}(\lambda)$$

$$D_{X_{la}}(\lambda) = C_{X_{la}} \varepsilon_{X_{la}} \left( 1,111e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 421,6}{40,8} \right)^2} + 0,129e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 439,4}{10,7} \right)^2} + \right. \\ \left. + 0,181e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 574,7}{27,4} \right)^2} + 0,424e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 634,2}{38,6} \right)^2} + 0,766e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 674,7}{14,9} \right)^2} + 0,149e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 683,6}{6,3} \right)^2} \right) \quad (2)$$

$$D_{X_{lb}}(\lambda) = C_{X_{lb}} \varepsilon_{X_{lb}} \left( 1,437e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 478,9}{21,8} \right)^2} + 0,136e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 589,6}{13,3} \right)^2} + 1,002e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 649,2}{7,8} \right)^2} \right)$$

$$D_{\text{сум.кар.}}(\lambda) = C_{\text{сум.кар.}} \varepsilon_{\text{сум.кар.}} \left( 0,906e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 490,3}{33,0} \right)^2} + 0,117e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 500,0}{13,5} \right)^2} + 0,085e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda - 543,3}{12,2} \right)^2} \right)$$

где:  $D(\lambda)$  – общая оптическая плотность, отн. ед.

$D_{X_{la}}(\lambda)$  – оптическая плотность хлорофилла а

$D_{X_{lb}}(\lambda)$  – оптическая плотность хлорофилла b

$D_{\text{сум.кар.}}(\lambda)$  – оптическая плотность суммарных каротиноидов.

$C_{X_{la}}(\lambda)$  – концентрация хлорофилла а (г / л)

$C_{X_{lb}}(\lambda)$  – концентрация хлорофилла b (г / л)

$C_{\text{сум.кар.}}(\lambda)$  – концентрация суммарных каротиноидов (грамм / литр)

$\varepsilon_{X_{la}}$  – экстинкция хлорофилла а  $88,15 \text{ (л г}^{-1} \text{ см}^{-1})$  [17]

$\varepsilon_{X_{lb}}$  – экстинкция хлорофилла b  $51,36 \text{ (л г}^{-1} \text{ см}^{-1})$  [17]

$\varepsilon_{\text{сум.кар.}}$  – экстинкция суммарных каротиноидов (лютеин)  $255 \text{ (литр г}^{-1} \text{ см}^{-1})$  [17]

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод разделения нативного спектра поглощения культуры можно использовать на практике для быстрого определения содержания пигментов, не прибегая к их экстракции. Поскольку в точке максимума хлорофилла а 677 нм другие пигменты (каротиноиды и хлорофилл b) не вносят существенный вклад, то можно использовать значение оптической плотности в данной точке для вычисления концентрации хлорофилла а, разделив данное значение на величину экстинкции хлорофилла а -  $88,15 \text{ (л г}^{-1} \text{ см}^{-1})$  [17]. Для более точного анализа пигментов и разделения каротиноидов рекомендуем использовать анализ ацетонового экстракта микроводоросли методом GPS [12]

Исследования выполнены в рамках Госзадания ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118021350003-6.

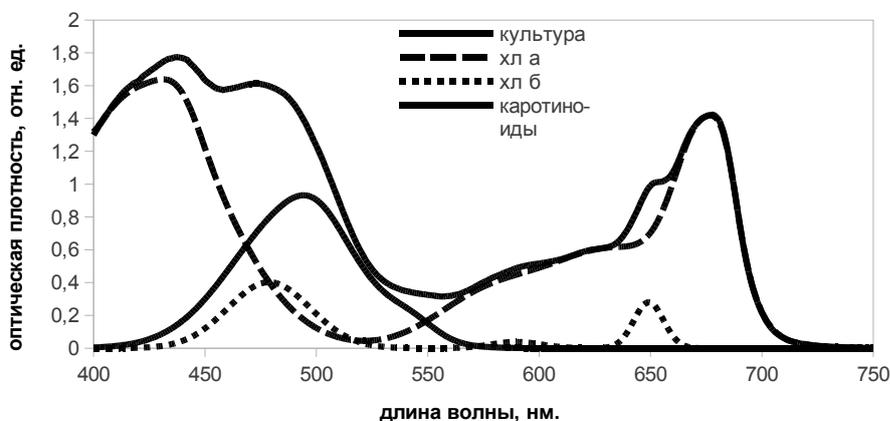


Рисунок 5. Разделение спектра поглощения культуры на спектры отдельных пигментов

**Список литературы / References:**

1. Bidigare R.R. et al. In-vivo absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X. International Society for Optics and Photonics*, 1990, vol. 1302, pp. 290-302.
2. Чурилова Т.Я., Финенко З.З., Акимов А.И. *Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. [Churilova T.Ya., Finenko Z.Z., Akimov A.I. *Black Sea microalgae: problems of biodiversity conservation and biotechnological use*. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2008. (In Russ.)]
3. Guiry M.D., Guiry G.M. 2019. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara, 1980, URL: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=838159> on 2019-12-10.
4. Роухияйнен М.И. Новый вид рода *Platymonas* (Chlorophyta) из зеленых водорослей. *Новости систематики низших растений*. М.-Л: Наука, 1966. с. 82-85. [Rokhiyaynen M.I. A new species of the genus *Platymonas* (Chlorophyta) from green algae. *News of the taxonomy of lower plants*. М.-Л: Nauka, 1966, pp. 82-85. (In Russ.)]
5. Тренкеншу Р. П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Изв. СО АН СССР (сер. Биол.)*, 1981, № 15, вып. 3, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Izv. SB USSR Academy of Sciences (ser. Biol.)*, 1981, no. 15, iss. 3, pp. 75-82. (In Russ.)]
6. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура. *Экология моря*, 2005, вып. 67, с. 89-97. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth. 1. Periodic culture // *Ecology of the sea*, 2005, iss. 67, pp. 89-97. (In Russ.)]
7. 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 installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1 (13). URL: <http://algology.ru/1097>. (In Russ.)]
8. Боровков А.Б., Геворгиз Р.Г. Продуктивность *Spirulina platensis* и *Tetraselmis viridis* при использовании различных методов культивирования. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 9-13. [Borovkov A.B., Gevorgiz R.G. Productivity of *Spirulina platensis* and *Tetraselmis viridis* when using various cultivation methods. *Ecology of the Sea*, 2005, iss. 70, pp. 9-13. (In Russ.)]
9. Владимирова М.Г., Семененко В.Е. *Интенсивная культура одноклеточных водорослей*. Москва. АН СССР, 1962, 60 с. [Vladimirova M.G., Semenenko V.E. *Intensive culture of unicellular algae*. Moscow. USSR Academy of Sciences, 1962, 60 p. (In Russ.)]
10. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015. [Kopytov Yu.P. et al. Methodology for the complex determination of the biochemical composition of microalgae. *Algology*, 2015. (In Russ.)]
11. Wellburn R.W. 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.
12. 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.
13. Raes E.J., Isdepsky A, Muylaert K, Borowitzka M.A, Moheimani N.R. Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. *J. Appl. Phycol.*, 2014, vol. 26, pp. 247-255, DOI: 10.1007/s10811-013-0077-5.
14. Гуляев Б.А., Литвин Ф.Ф. Первая и вторая производная спектра поглощения хлорофилла и сопровождающих пигментов в клетках высших растений и водорослей при 20°C. *Биофизика*, 1970, т. 15, № 4, с. 670-680. [Gulyaev B.A., Litvin F.F. The first and second derivative of the absorption spectrum of chlorophyll and accompanying pigments in the cells of higher plants and algae at 20°C. *Biophysics*, 1970, vol. 15, no. 4, pp. 670-680. (In Russ.)]
15. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, vol. 73, no. 1, pp. 11-23.
16. Smith E.L. The action of sodium dodecyl sulfate on the chlorophyll-protein compound of the spinach leaf. *The Journal of General Physiology*, 1941, vol. 24, no. 5, p. 583.
17. Mantoura R. F. C., Wright S. W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *Oceanographic Literature Review*, 1997, vol. 10, no. 44, p. 1110.

**DECOMPOSITION OF CULTURAL ABSORPTION SPECTRA AND THE ACETONE EXTRACT OF MICROALGAE *TETRASELMIS VIRIDIS* INTO SPECTRUM OF INDIVIDUAL PIGMENTS****Chernyshev D.N.<sup>1</sup>, Gorbunova S.Yu.<sup>2</sup>, Trenkenshu R.P.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Sevastopol State University*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: chernishev@gmail.com*<sup>2</sup> A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia*

**Abstract.** In this work, we divided the absorption spectrum of the acetone extract of the *Tetraselmis viridis* microalgae by GPS into the spectra of individual pigments. The main pigments were lutein, neoxanthin chlorophyll a and chlorophyll b. In the culture spectrum, using the second-order derivative, individual absorption maxima were revealed. The data obtained are taken as a basis when compiling a model of the spectrum of native pigment forms. Models of native forms of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total photoprotective carotenoids are proposed. The obtained mathematical models of the absorption spectra of individual pigments and literature extinction coefficients can be used to quickly calculate the concentration of pigments in the culture.

**Key words:** *marine microalgae, Tetraselmis viridis, chlorophyll a, chlorophyll b, absorption spectra, gaussians.*