

## ДЕКОМПОЗИЦИЯ КРАСНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ – НАЧАЛЬНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Гулин А.С.<sup>1</sup>, Тренкеншу Р.П.,<sup>1</sup> Чернышев Д.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»  
ул. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: gulins\_gent@mail.ru

<sup>2</sup> Севастопольский государственный университет  
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

**Аннотация.** В работе описан выбор логической модели, а также режима стабилизации для систем автоматического контроля роста микроводорослей. Спектры поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina*, были количественно описаны тремя кривыми Гаусса в области от 550 до 700 нм. Так же описаны нормированные спектры культур микроводоросли *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* и определена разность спектров поглощения в области 550-700 нм. По результатам аппроксимации разности спектров поглощения культур, получена модель хлорофилла *b*. На основании полученных данных, а также их сравнения, сделан вывод, что данная модель удовлетворяет требованиям, предъявляемым к проектируемой приборной базе.

**Ключевые слова:** спирулина, хлорофилл *a*, спектры поглощения, гауссианы, система автоматического контроля роста микроводорослей.

### ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации пигментов в культурах микроводорослей, является сложной задачей, как в теоретическом, так и в практическом плане. Количественное определение пигментов является важной задачей в физиологии фотосинтетических организмов, поскольку состав пигмента различается в зависимости от вида, ткани и физиологического состояния. В настоящее время доступные различные методы определения, но они либо ограничены очень немногими пигментами (классические УФ/ВИС спектроскопические методы), либо они отнимают много времени, либо слишком трудоемки или требуют дорогостоящей приборной базы (например, ВЭЖХ)

Как правило, в современных исследованиях используются методы, связанные с выделением пигментов из клеток путем их разрушения с дальнейшим экстрагированием. [1]. В подавляющем большинстве случаев оценка концентрации выделенных пигментов определяется спектрофотометрически.

Создание современного спектрофотометрического оборудования и автоматизированных систем контроля роста микроводорослей, требуют от нас разработки моделей и алгоритмов для определения концентрации пигментов в культурах.

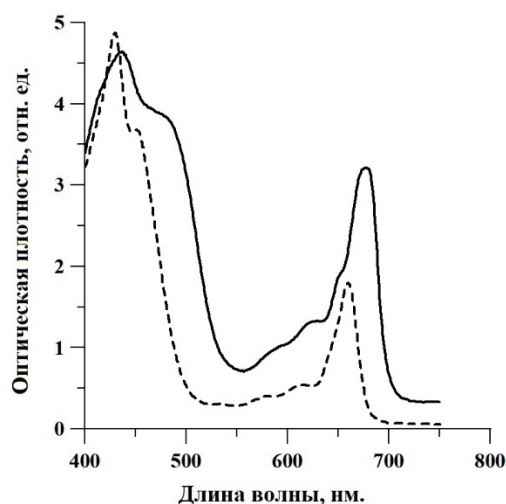
Существующие устройства не лишены ряда проблем, таких как высокая стоимость и сложность реализации, а также не универсальность и узкая направленность. Существующие системы обратной связи, работают в различных режимах стабилизации (турбидостат, рН-стат, хлорофиллостат и т. п.). Все режимы имеют свои достоинства и недостатки, но наибольшую точность и стабильность, может обеспечить только режим хлорофиллостата.

Режим хлорофиллостата заключается в стабилизации хлорофилла *a*, как основного пигмента. Для стабилизации его значения, необходимо создать прибор, который будет непрерывно измерять значение хлорофилла *a*.

При разработке подобного устройства, мы неизбежно сталкиваемся с рядом сложностей. Хлорофилл *a* имеет спектральные характеристики, и чтобы определить его значение, необходимо отделить от других пигментов. Для этого нужно обеспечить выбор по длине волны. В нативной культуре, максимум хлорофилла *a* в красной области приходится на 680 нм, но там же накладывается и хлорофилл *b*, что приводит к задаче определения формулы, для отделения хлорофилла *a* от хлорофилла *b*.

Для примера рассмотрим спектры культур *Platimonas viridis* и *Dunaliella salina* в красной области (рис. 1).

После нормировки максимумы в красной области совпадают, но плечо хлорофилла *b* разное.



**Рисунок 1.** Спектр поглощения культуры микроводоросли *Platimonas viridis* и *Dunaliella salina*

Современной науке хорошо известны способы определения пигментов в нативной культуре микроводорослей. Так, с хорошей точностью концентрация хлорофилла *a* коррелирует с красным максимумом поглощения в области длины волны 680 нм, определенной, относительно 730-750 нм, ( $\Delta D_{680} = D_{680} - D_{730}$ ) для хлореллы [2]. Такой же коэффициент, (сечение поглощения хлорофилла *a*) был получен для морской микроводоросли *Platimonas viridis* [3].

В то же время, хорошо изучены оптические свойства пигментов, выделенных из клетки с помощью различных растворителей [4]. Было установлено, что спектры растворов пигментов имеют несколько максимумов, каждый из которых определяется наличием хромофорных групп. Эти группы симметрично распределены относительно максимума, что позволяет количественно описать зависимость поглощения от длины волны в виде суммы гауссиан или лоренциан. [5]

Этот подход применим для растворов хлорофиллов и каротиноидов [6]. При переходе к нативным формам пигментов максимумы сдвигаются. [7]

Спектр поглощения культур микроводорослей от 400 до 750 нм характеризуется сплошной кривой, отражая сильную связь в передаче энергии между молекулами пигментов. Непрерывный характер спектра, в свою очередь затрудняет оценку вклада в общее поглощение каждым видом пигмента, если только спектр не может быть соответствующим образом разложен. Данный метод основан на описании каждого спектра пигмента серией пиков Гаусса.

В данной работе представлена возможность использования описанного выше метода, для определения концентрации пигментов в культурах микроводорослей, как логической модели для автоматической системы контроля микроводорослей.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Культуру *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl, из коллекции культур ФИЦ ИНБИОМ РАН, выращивали в культиваторах на среде «Zagrouk», в накопительном режиме, освещенность поверхности культиватора – 80 Вт/м<sup>2</sup>, температура – 26-28°C.

Экстрагирование пигментов из клеток микроводоросли производилось ацетоном (100%) [1]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов и фиксировались на спектрофотометре *Unico 4802*, в диапазоне от 400 до 800 нм, в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Спектры нативных культур регистрировались на спектрофотометре *Lambda 35* с интегрирующей сферой.

Опишем спектр поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Spirulina platensis* в области 550-700 нм (рис. 2).

Зададим базовую линию на уровне 0,009, соответствующую нулевому значению оптической плотности на длине волны 750 нм.

Для моделирования выберем область спектра от 550 до 700 нм т.к. спектральные характеристики хлорофилла *a* особенно велики. Спектр ацетонового экстракта хлорофилла *a* *S. platensis*, был описан в области 550-700 нм тремя кривыми Гаусса (рис. 3).

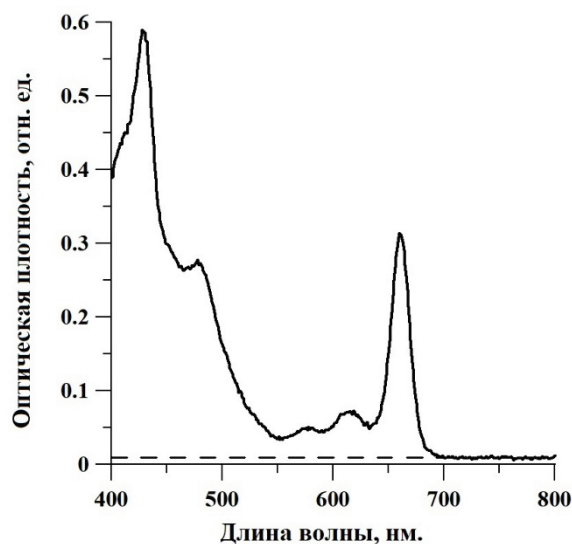


Рисунок 2. Спектр поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Spirulina platensis*

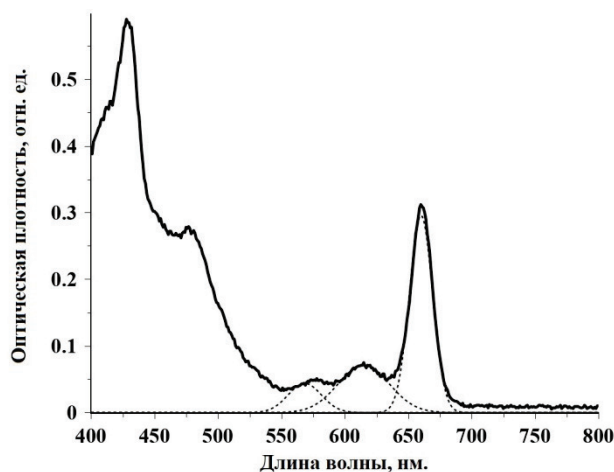


Рисунок 3. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* в области 550-700 нм

$$D(\alpha) = \sum_{i=1}^n D_{max} \exp\left(-\frac{(\alpha - \alpha_{max})^2}{\sigma^2}\right)$$

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.

Аппроксимация проводилась методом доверительных областей с заданными ограничениями и начальными параметрами. Коэффициент детерминации  $R^2$  составил 0,946. Результаты аппроксимации приведены в таблице 1.

Нормированные по амплитуде результаты приведены в таблице 2.

Таблица 1. Коэффициенты модели ацетонового экстракта хлорофилла *a*.

№ пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	568,5	15,4	0,048
2	615	23,74	0,071
3	660,16	10,2	0,2955

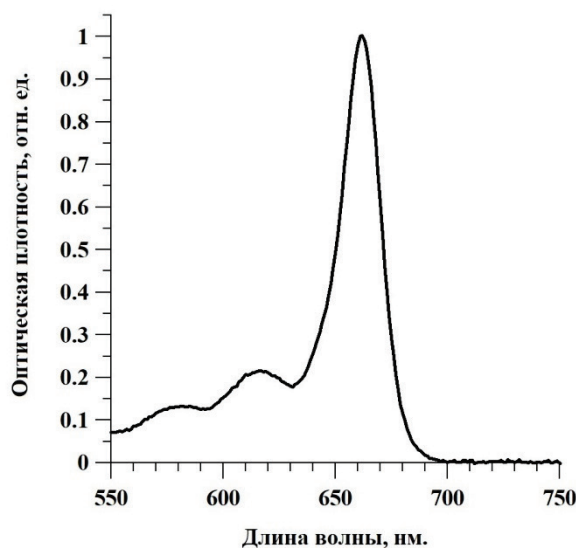
**Таблица 2.** Коэффициенты модели ацетонового экстракта хлорофилла *a* после нормировки по амплитуде

№ пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	568,5	15,4	0,15
2	615	23,74	0,24
3	660,16	10,2	1

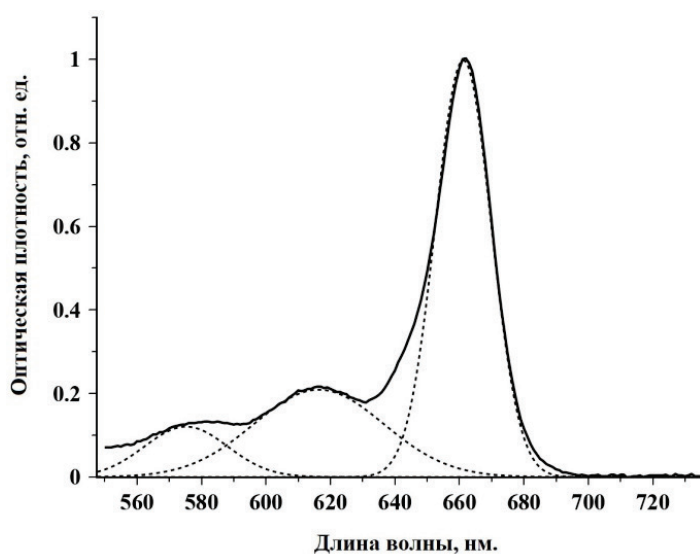
Основная проблема, возникающая при переходе от спектров растворов пигментов к измерению оптических характеристик нативных культур микроводорослей, является то, что в клетке пигменты имеют гетерогенную структуру. Пигменты упакованы определенным образом, в результате это приводит к изменению максимумов поглощения и к изменению полуширины отдельных пиков. Пики нативного хлорофилла *a* в области 550-730 нм сдвигаются на +12 нм [7]. На положение максимумов в области до 580 нм оказывает влияние, наличие каротиноидов, которые вносят вклад в спектр поглощения.

Опишем нормированный спектр поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina* в области 550-700 нм (рис. 4).

Опишем спектр ацетонового экстракта хлорофилла *a* *Dunaliella salina* в области 550-700 нм тремя кривыми Гаусса (рис. 5).



**Рисунок 4.** Спектр поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina*



**Рисунок 5.** Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* *Dunaliella salina* в области 550-700 нм

Таблица 3. Результаты аппроксимации

№ пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	572	15,2	0,13
2	616	23,71	0,21
3	661	10,1	0,99

Полученные в результате разложения спектров на суммы Гауссиан значения амплитуды и положения максимумов пиков, позволяют нам сделать вывод, что содержания хлорофилла *a* в *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina*, можно считать равным в пределах допустимой ошибки.

Рассмотрим нормированные спектры поглощения культур *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* в области 550-700 нм, а также определим их разность (рис. 6).

Проанализируем, полученную разность спектров используя аппроксимацию по Гауссу (рис. 7). Результаты аппроксимации приведены в таблице 4.

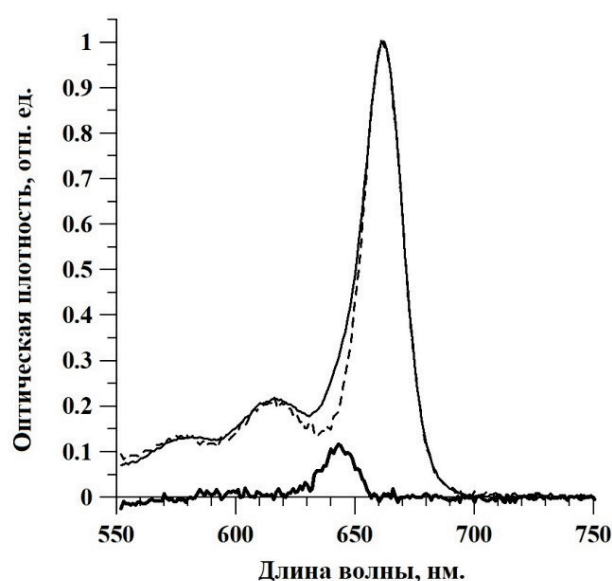


Рисунок 6. Нормированные спектры поглощения культур *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* и разность спектров в области 550-700 нм

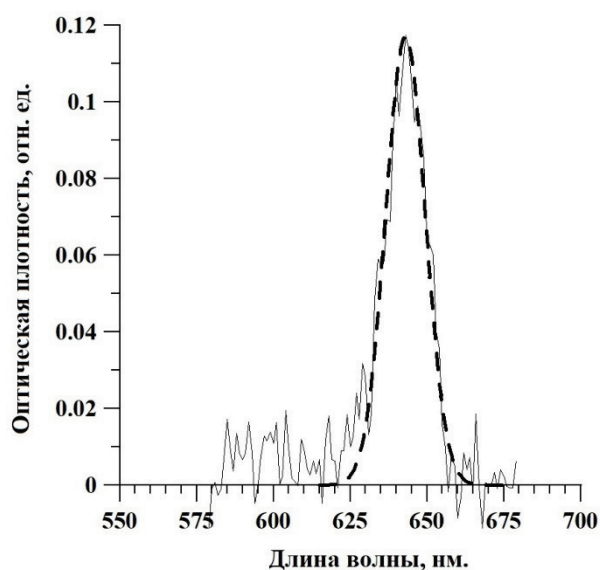


Рисунок 7. Аппроксимация разности спектров поглощения культур *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* в области 550-700 нм

Таблица 4. Коэффициенты модели хлорофилла *b*

Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
643	6,88	0,117

Таблица 5. Сравнение положения и амплитуды максимумов

Пигмент	Амплитуда максимума	Положение максимума, нм
Хл <i>a</i> (эксперимент)	0,99	660,16
Хл <i>b</i> (эксперимент)	0,0117	643
Хл <i>a</i> (Кюппер)	0,0585	661,7
Хл <i>b</i> (Кюппер)	0,01301	641,9

При сравнении полученных данных (табл. 5) с результатами, представленными в литературе [8], мы видим совпадения положения максимумов пиков для хлорофилла *a* и хлорофилла *b* по длине волны. Так же близкий результат получаем при сравнении отношения максимумов хлорофилла *a* и хлорофилла *b* по амплитуде. Отклонения в результате есть, но они вызваны приборной погрешностью при снятии спектра опытной культуры.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученный результат удовлетворяет требованиям, предъявляемым к проектируемой приборной базе по точности, и позволяет обойтись минимальным значением Гауссиан.

Проведенный эксперимент, показал, что для систем автоматического контроля роста микроводорослей, в качестве логической модели мы можем использовать метод Кюппера [5], но с меньшим количеством гауссиан, что позволит в свою очередь снизить стоимость аппаратной части.

#### Список литературы / References:

1. 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.)]
2. Сидько Ф.Я., Белянин В.Н. Рост и эффективность фотосинтеза хлореллы при прерывистом облучении. *Доклады Академии наук СССР*. Изд-во Академии наук СССР, 1976, т. 230, № 4-6, с. 998. [Sidko F.Ya., Belyanin V.N. Growth and efficiency of chlorella photosynthesis under intermittent irradiation. *Doklady of the USSR Academy of Sciences*. Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, 1976, vol. 230, no. 4-6, pp. 998. (In Russ.)]
3. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch, 1979. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. Influence of mineral nutrition elements on the productivity of the alga *Platymonas viridis* Rouch, 1979. (In Russ.)]
4. Jeffrey S.W. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. *Phytoplankton pigments in oceanography*, 1997, pp. 449-559.
5. 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.
6. Чернышев Д.Н., Боровков А.Б. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *Dunaliella salina*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, № 1-1, с. 51-56. [Chernyshev D.N., Borovkov A.B. Separation of the absorption spectrum of the acetone extract of *Dunaliella salina*. *Actual problems of biological physics and chemistry*, 2016, no. 1-1, pp. 51-56. (In Russ.)]
7. 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. 290-303.
8. Küpper H., Spiller M., Küpper F.C. Photometric method for the quantification of chlorophylls and their derivatives in complex mixtures: fitting with Gauss-Peak spectra. *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 286, no. 2, pp. 247-256.

**DECOMPOSITION OF THE RED AREA OF THE ABSORPTION SPECTRUM - THE INITIAL METHOD OF EVALUATING THE PIGMENTAL COMPOSITION OF MICROALGAE****Gulin A.S.<sup>1</sup>, Trenkenshu R.P.<sup>1</sup>, Chernyshev D.N.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: gulins\_gent@mail.ru*<sup>2</sup>Sevastopol State University*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia*

**Abstract.** The paper describes the choice of a logical model, as well as the stabilization mode for automatic control systems of microalgae growth. The absorption spectra of the culture and acetone extracts of the microalgae *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina* were quantitatively described by three Gauss curves in the range from 550 to 700 nm. The normalized spectra of cultures of the microalgae *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina* are also described, and the difference in the absorption spectra in the region of 550-700 nm is determined. Based on the results of approximating the difference in the absorption spectra of the cultures, a model of chlorophyll b was obtained. Based on the data obtained, as well as their comparison, it was concluded that this model meets the requirements for the designed instrument base.

**Key words:** *spirulina, chlorophyll a, absorption spectra, Gaussians, system of automatic control of microalgae growth.*