

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Клочкова В.С.¹, Лелеков А.С.², Геворгиз Р.Г.², Ширяев А.В.², Бучельников А.С.¹, Шупова Е.В.¹

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

² ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» РАН

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

Поступила в редакцию: 28.07.2021

Аннотация. Исследовано изменение истинного спектра ослабления в накопительной культуре *Arthrospira (Spirulina) platensis*. В работе использовался двухлучевой спектрофотометр Lambda 365 Double Beam UV-Visible, который оснащён интегрирующей сферой (ИС). Особенность конструкции ИС заключается в том, что она собирает только прошедший свет и основную часть света, рассеянного в прямом направлении. Измерив спектры поглощения образца вблизи и на расстоянии 1 см от интегрирующей сферы, рассчитан спектр поглощения, скомпенсированный на рассеяние. При стандартном расположении кюветы (близко к ИС) оптическая плотность в диапазоне 750–800 нм не принимает нулевые значения. Оптическая плотность монотонно растёт с увеличением расстояния между кюветой и ИС. Это связано с селективным (у пигментов) и неселективным (у клеток микроводоросли) рассеяниями. Определён поправочный коэффициент ослабления света как среднее значение всех L в диапазоне 750–800 нм, который составил 1,61. На основании полученных истинных спектров поглощения показано, что в процессе роста накопительной культуры, при отсутствии лимитирования биогенными элементами, соотношения между пигментами не изменялись: хл а/кар = 1,36 и хл а/С-ФЦ = 1,06.

Ключевые слова: спирулина, спектры ослабления, интегрирующая сфера, коэффициент ослабления света, истинный спектр поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Распространение световых волн в водной среде определяет оптические свойства фитопланктона. В природных водах растворённые органические и неорганические соединения, микроводорослей, зоопланктон могут подвергаться различным изменениям за счёт процессов поляризации, рассеяния и поглощения света [1]. Свет становится частично поляризованным и теряет интенсивность в основном на красных, желтых и фиолетовых длинах волн при распространении в воде [2]. Доступное количество световой энергии для фотосинтеза определяется эффективностью поглощения света и его спектром. Поглощённая энергия электромагнитного излучения преобразуется в энергию углеводов в цикле Кальвина. В дальнейшем углеводы используются для биосинтеза, клеточного дыхания и других метаболических процессов [3]. Свет часто является лимитирующим фактором, который определяет скорость роста микроводорослей. Если интенсивность света слишком низкая, клеточное дыхание потребляет углеводы с большей скоростью, чем они синтезируются, при этом структурные компоненты биомассы не образуются. С другой стороны, если интенсивность света высокая, в фотосистеме II образуются свободные радикалы, которые являются причиной фотоокислительного повреждения пигментов и даже гибели клеток. В дополнение к свету существуют также другие абиотические факторы, влияющие на скорость роста микроводорослей: температура, солёность, концентрация биогенных веществ, CO₂, O₂, pH, а также токсичные химические вещества [4].

Процессы фотосинтеза, флюоресценции, рассеяния поглощённого света в виде тепла и др., протекающие в клетках микроводорослей, зависят от длины волны падающего света. Видимый свет охватывает длины волн примерно от 390 нм (фиолетовый) до 780 нм (красный) электромагнитного спектра, почти полностью совпадая с диапазоном фотосинтетически активного излучения (ФАР) (380–710 нм). Источники света, такие как солнце, светодиодные лампы или люминесцентные лампы, имеют различные распределение интенсивности (спектр излучения), зависящее от длины волны [1].

Снижение интенсивности светового потока происходит не только при поглощении света, но и в результате светорассеяния. Вследствие многократного отражения и рассеяния в образце (особенно в суспензиях клеток или других мутных средах) световой пучок отклоняется от своего первоначального направления. В результате при измерениях на фотоприёмник попадает не весь прошедший через объект свет, а измеряемая оптическая плотность, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, повышается. Поэтому зависимость оптической плотности образца от длины волны корректнее называть спектром ослабления светового потока. Спектр, скомпенсированный на рассеяние или записанный на спектрофотометре, оснащённом системой сбора рассеянного света, является истинным спектром поглощения.

Простые прямые однолучевые и двухлучевые спектрофотометры являются стандартным лабораторным оборудованием, но их ограничения не дают достоверных измерений спектральных свойств пигментов живых клеток из-за смешивающих эффектов рассеяния света. Как правило, закон Бугера-Ламберта-Бера применим

только для прозрачных (оптическая плотность меньше 1) растворов вещества [5]. Спектрофотометры с прямым пучком имеют источник света, образец и детекторный диод на одной линии и поэтому не измеряют количественно рассеянный свет. Кроме того, фактическое количество рассеянного света очень сильно зависит от геометрии кюветы для образца и детектора в этом конкретном спектрофотометре и, следовательно, является приборным параметром. Если для измерения луча света, проходящего через суспензию микроводорослей, используется спектрометр прямого или двухлучевого излучения, то термин "оптическая плотность" часто используется вместо коэффициента поглощения, потому что измеренная оптическая плотность на данной длине волны будет представлять собой комбинацию рассеяния света клетками (турбидиметрия) и поглощения пигментами в клетках.

Один из способов устранения потерь рассеянного света – использование в спектрофотометрах интегрирующей сферы [5]. Образец помещается вовнутрь такой сферы, внутренняя поверхность которой хорошо отражает свет. Весь рассеянный свет попадает на фотодетектор, так что измеряемая оптическая плотность обусловлена только истинным поглощением образца. Помимо инструментальных способов учёта светорассеяния используют поправочные коэффициенты. Если регистрировать спектры поглощения образца на разном расстоянии от интегрирующей сферы [6,7], то можно изменять вклад светорассеяния: чем ближе образец к интегрирующей сфере, тем больше рассеянного света попадает на фотодетектор и оптическая плотность образца становится меньше. Измерив спектры поглощения образца вблизи и вдали от интегрирующей сферы, можно рассчитать спектр поглощения, скомпенсированный на рассеяние, и спектр рассеяния света [8].

Целью работы – исследование изменения истинного спектра ослабления в накопительной культуре *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе кафедры «Физика» СевГУ (г. Севастополь). Объектом исследования являлась спирулина *Arthrospira (Spirulina) platensis*, полученная из коллекции из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ. Выращивание проводилось в колбе объёмом 250 мл на среде Заррук [9] (для приготовления среды использовалась дистиллированная вода) методом накопительной культуры. В качестве источника освещения применялась световая решётка из люминесцентных ламп Philips Daylight 54-765. Средняя освещённость рабочей поверхности составляла 5 клк. Объём культуры составлял 200 мл. Барботаж: 0,5 л воздуха на литр культуры в минуту.

Отбор проб для определения оптической плотности и сухого веса проводили из разных областей, находящихся внутри колбы: отбирали по 5 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 30 мл. В средней пробе после перемешивания определяли коэффициент пропускания. Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, измерения проводили относительно дистиллированной воды, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. При пересчёте единиц оптической плотности на сухую биомассу (СВ) использовали рассчитанный коэффициент 1. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (если значение пропускания становилось меньше 30%), пробу разбавляли дистиллированной водой.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне от 400 до 800 нм с шагом 1 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO_4). Кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см располагали в стандартном положении и на расстоянии 1 см от входного окна ИС. Спектры записывались на первые сутки эксперимента (без разбавления пробы), на третьи (разбавление 1:2) и на пятые (1:3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе эксперимента получена накопительная кривая роста *A. platensis*, представленная на рисунке 1. Экспоненциальная фаза роста, которая представлена на рисунке с 0 по 2 сутки эксперимента, характеризуется постоянством удельной скорости роста ($\mu_m = \text{const}$), т. к. клетки не затеяют друг друга [4]. Аппроксимация этого участка позволила определить величину μ_m , которая составила $0,67 \text{ сут}^{-1}$:

$$B = 0,12 \cdot e^{0,67 \cdot t}.$$

Линейная фаза роста, представленная на рисунке с 2 по 4 сутки эксперимента, характеризуется постоянством максимальной продуктивности культуры P_m , которая в свою очередь определяется величиной светового потока на ключевой фермент [4]. Аппроксимация линейной фазы роста позволила определить величину P_m , которая составила $0,40 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$:

$$B = 0,49 + 0,40 \cdot (t - 2).$$

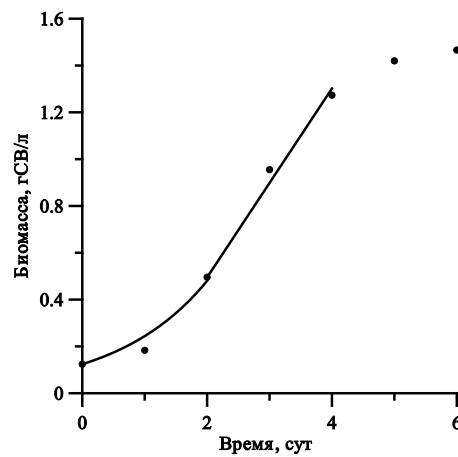


Рисунок 1. Накопительная кривая роста культуры *A. platensis*. Линия – аппроксимация экспоненциальной (0-2 сут) и линейной фаз (2-4 сут). Значения коэффициентов в тексте

На рисунке 2 показаны спектры поглощения плотной культуры *A. platensis*, записанные на спектрофотометре Lambda в кювете на разных расстояниях от ИС. Следует отметить, что при стандартном расположении кюветы (близко к ИС) оптическая плотность $D(\lambda; 0)$ в диапазоне 750–800 нм, где пигменты не способны к поглощению, не принимает нулевые значения. В этой области оптическая плотность монотонно растёт с увеличением расстояния между кюветой и ИС. Это связано с наличием неселективного рассеяния у клеток микроорганизмов, которое обусловлено резкими изменениями показателя преломления на межфазных границах. Вероятно, свой вклад вносит и селективное рассеяние, которое вызвано резкими изменениями показателя преломления пигментами, встроенными в тилакоидные мембраны, в области поглощения света [8].

Истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние, определялся по формуле [5]:

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; r) - L_{\text{осл-е}}(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (1)$$

где $D(\lambda; r)$ – оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ – поправочный коэффициент ослабления света; $D(\lambda; 0)$ – оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы.

Предполагается, что поправочный коэффициент ослабления света $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ не зависит от длины волны и его значение может быть определено, перейдя в область длин волн, в которой образец не поглощает (т. е. к области 750–800 нм видимого диапазона):

$$L_{\text{осл-е}}(r; 0) = \frac{D_{750-800}(\lambda; r)}{D_{750-800}(\lambda; r) - D_{750-800}(\lambda; 0)} \quad (2)$$

Рассмотрим расчёт истинного спектра поглощения на примере спектров, полученных на момент первых суток проведения эксперимента (рис. 2 А).

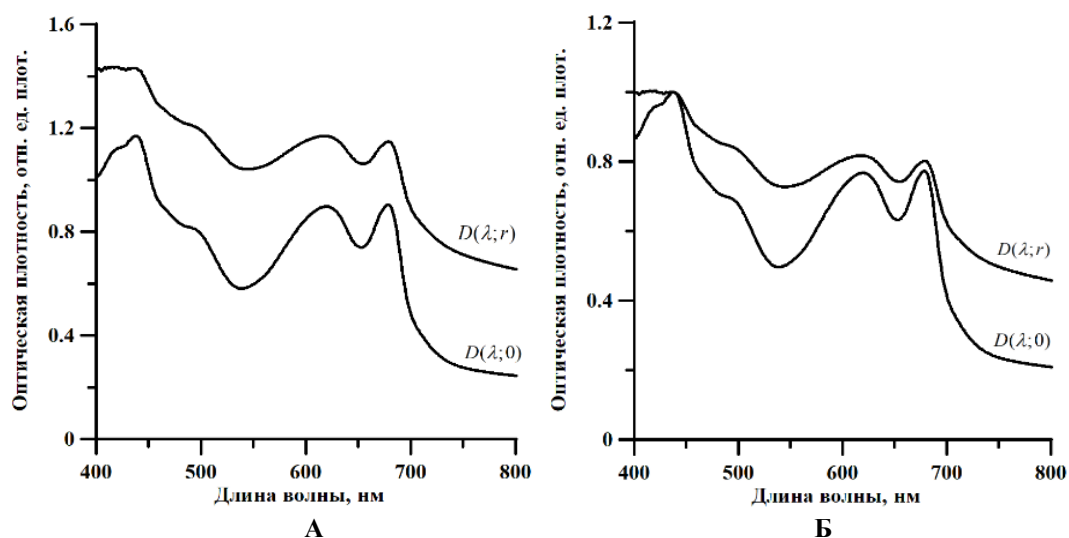


Рисунок 2. Спектры оптической плотности (А) и нормированные (на 440 нм) спектры (Б) культуры *A. platensis*, полученный при стандартном положении кюветы ($D(\lambda; 0)$) и на расстоянии ($D(\lambda; r)$) от входного окна ИС

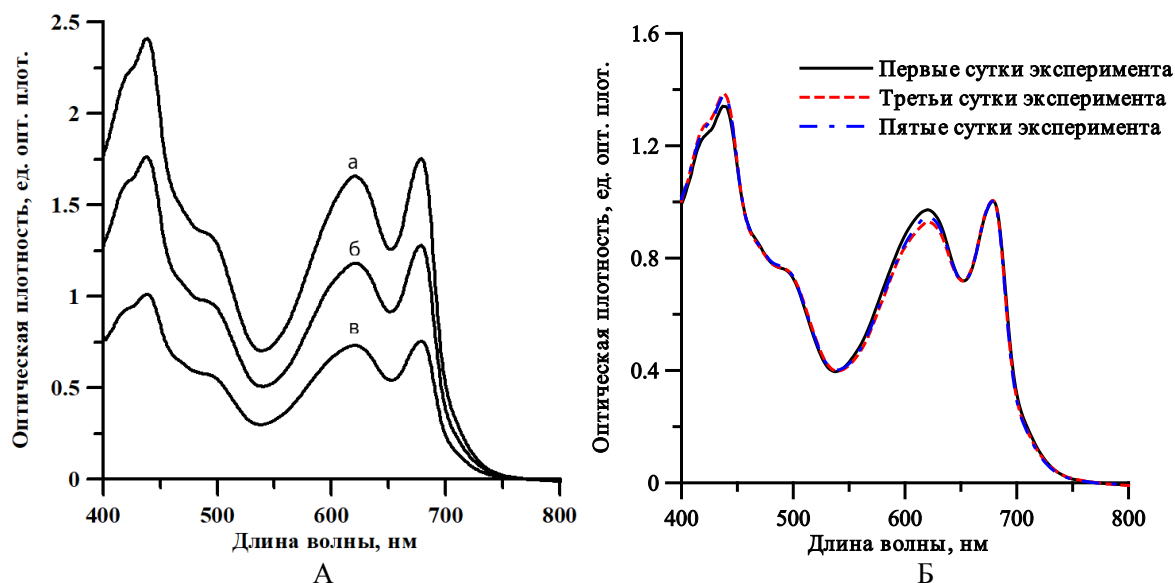


Рисунок 4. Истинные спектры поглощения (А) и нормированные на 680 нм спектры (Б) при различной плотности культуры *A. platensis*, на первые (а), третьи (б) и пятые (в) сутки эксперимента, при использовании выражения (1)

Первым делом необходимо определить значение поправочного коэффициента ослабления света $L_{осл-е}(r;0)$ в области 750–800 нм. Используя (2), проведём расчёт для некоторых значений λ :

$$L_{750} = \frac{D(750;r)}{D(750;r) - D(750;0)} = \frac{0,71}{0,71 - 0,28} = 1,65$$

$$L_{775} = \frac{D(775;r)}{D(775;r) - D(775;0)} = \frac{0,68}{0,68 - 0,26} = 1,62$$

$$L_{800} = \frac{D(800;r)}{D(800;r) - D(800;0)} = \frac{0,65}{0,65 - 0,24} = 1,58$$

Как видно из расчётов, поправочный коэффициент ослабления меняется с увеличением длины волны. На используемом спектрофотометре Lambda эта величина незначительно убывает. Поэтому для расчётов будем использовать длину волны 800 нм. Также, согласно некоторым методикам [6], можно использовать среднее значение L в области 750–800 нм. В работе использовался коэффициент $L_{осл-е}(r;0) = 1,61$.

Используя формулу (1), рассчитаем истинное значение оптической плотности для каждой длины волны:

$$\tilde{A}(400) = 1,43 - 1,61 \cdot [1,43 - 1,02] = 0,77$$

Проведя аналогичные расчёты для остальных спектров, полученных на момент третьих и пятых суток эксперимента, получим истинные спектры поглощения культуры *A. platensis*, компенсированные на рассеяние (рис. 4).

Истинные спектры поглощения, полученные с использованием выражения (1), характеризуются отсутствием поглощения в диапазоне 750–800 нм (рис. 4). Это свидетельствует о том, что в процессе роста накопительной культуры концентрация основных фотосинтетических пигментов спирулины, а именно хлорофилла а, каротиноидов и С-фикоцианина, увеличивалась пропорционально, соотношения между ними не изменяются. Результаты приведены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано изменение истинного спектра ослабления в накопительной культуре *A. platensis*. При снятии спектров использовался спектрофотометр Lambda, оснащённый интегрирующей сферой. Её особенность

Таблица 1. Соотношения пигментов при разной плотности культуры

Соотношения пигментов	λ , нм	А	Б	В
Хл а/кар	680/500	1,376	1,363	1,364
Хл а/С-ФЦ	680/620	1,028	1,078	1,056

заключается в том, что она собирает только прошедший свет и основную часть света, рассеянного в прямом направлении. Предложенный метод позволяет минимизировать неопределённость расчётов, связанных со светорассеянием. На основании полученных данных (истинных спектров поглощения) оценено изменение концентрации пигментов в процессе роста накопительной культуры спирулины, а также соотношения между ними. Применяв данную методику к кривым рассеяния, станет возможным определение дополнительной информации о свойствах клеток фотосинтезирующих микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИИ ФИЦ ИнБЮМ " № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Lehmuskero A., Skogen Chauton M., Boström T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 2018, vol. 168, pp. 43-56. doi: 10.1016/j.poccean.2018.09.002
2. Беспрозванных В.Г., Первадчук В.П. *Нелинейная оптика: учеб. Пособие*. Пермь: Изд-во Перм. гос. техн. ун-та, 2011, 200 с. [Besprozvannykh V.G., Pervadchuk V.P. *Nonlinear optics: textbook. Manual*. Perm: Publishing house of the Perm State Technical University. un-ta, 2011, 200 p. (In Russ.)]
3. Холл Д., Рао К. *Фотосинтез*: Пер. с англ. М.: Мир, 1983, 134 с. [Hall D., Rao K. *Photosynthesis*: TRANS. from English. M.: Mir, 1983, 134 p. (In Russ.)]
4. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей*. Белгород: ООО «КОНСТАНТА», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth*. Belgorod: CONSTANTA LLC, 2017, 152 p. (In Russ.)]
5. Ritchie R.J., Sma-Air S. Using integrating sphere spectrophotometry in unicellular algal research. *J. Appl. Phycol.*, 2020, vol. 32, no. 5, pp. 2947-2958. doi: 10.1007/s10811-020-02232-y
6. Merzlyak M.N., Naqvi, K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2000, vol. 58, pp. 123-129. doi: 10.1016/s1011-1344(00)00114-7
7. Davies-Colley R.J., Pridmore R.D., Hewitt J.E. Optical properties of some freshwater phytoplanktonic algae. *Hydrobiologia*, 1986, vol. 133, pp. 165-178. doi: 10.1007/BF00031865
8. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей. *Физиология растений*, 2008, т. 55, № 3, с. 464-470. [Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Maslova I.P., Nakvi R.K., Solovchenko A.E., Klyachko-Gurvich G.L. Spectra of light absorption and scattering by cellular suspensions of some cyanobacteria and microalgae. *Plant Physiology*, 2008, vol. 55, no. 3, pp. 464-470. (In Russ.)]
9. Zarrouk C. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D these, Paris, 1966, 114 p.

CHANGE IN THE OPTICAL DENSITY SPECTRUM OF THE BATCH CULTURE *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Klochkova V.S.¹, Lelekov A.S.², Shiryaev A.V.², Gevorgiz R.G.², Buchelnikov A.S.², Shupova E.V.²

¹ Sevastopol State University

33 Universitetskaya str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru

² FGBUN FRC Institute of Biology of the Southern Seas named after A.O. Kovalevsky RAS

Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Abstract. The change in the density spectrum of the batch culture *Arthrospira (Spirulina) platensis* was investigated. The two-beam spectrophotometer Lambda 365 Double Beam UV-Visible was used. The spectrophotometer was equipped with an integrating sphere (IS). The peculiarity of the IS design is that it collects only the past light and the main part of the light scattered in the straight direction. By measuring the absorption spectra of the sample near and at a distance of 1 cm from the integrating sphere, the absorption spectrum compensated for scattering is calculated. With the standard location of the cell (close to the IS), the optical density in the range of 750–800 nm was not take zero values. The optical density increased monotonously with increasing distance between the cell and the IS. This is due to selective (in pigments) and non-selective (in microalgae cells) scattering. The light attenuation coefficient is determined as the average value of all *L* in the range of 750–800 nm. In our case, this value was about 1.61. Based on the obtained true absorption spectra, it is shown that in the process of growth of the batch culture, the ratio between the pigments did not change. The ratios of chl *a*/car (1.36) and chl *a*/C-Phy (1.06) are considered. **Key words:** *spirulina*, *attenuation spectra*, *integrating sphere*, *light attenuation coefficient*, *true absorption spectrum*.