

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК В СУСПЕНЗИИ ВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

В.Р. Макаревич, А.А. Казимирчик, 2 курс
 Научный руководитель – **Н.П. Дмитрович, к.с.-х.н.**
Полесский государственный университет

Введение. *Haematococcus pluvialis* – широко распространенная пресноводная одноклеточная зеленая микроводоросль, принадлежащая к классу *Chlorophyceae*. При наступлении неблагоприятных условий клетки *H. pluvialis* приобретают ярко-красную окраску, которая обеспечивается накоплением большого количества вторичных каротиноидов, в том числе астаксантина [3, 7, 9]. Содержание астаксантина может достигать 3–5% от массы клетки и до 95% от общего количества каротиноидов [3, 5], однако, отмечено, что высокое содержание астаксантина в клетках может быть получено только при культивировании фотоавтотрофно, так как для процесса его биосинтеза необходим свет [7, 8].

Астаксантин является ценным каротиноидным пигментом с мощными антиоксидантными свойствами. Потребление астаксантина в качестве пищевой добавки дает многочисленные преимущества для здоровья человека [6]. Использование астаксантина как добавки к корму для рыб способствует его накоплению в тканях, придавая желаемую окраску [9]. На сегодняшний день большая часть применяемого астаксантина имеет искусственное происхождение, хотя и отмечено, что химически синтезированный пигмент обладает меньшей биологической активностью в сравнении с натуральным [3].

Вне зависимости от того, при каких условиях будет осуществляться культивирование, необходим строгий контроль роста водоросли. Одним из методов определения количества клеток является спектрофотометрия, позволяющая снизить трудоемкость процесса культивирования и контроля роста клеток. Исходя из этого целью настоящего исследования было определение зависимости между оптической плотностью суспензии водоросли и количеством клеток в процессе культивирования для построения уравнения регрессии, связывающего данные показатели.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследований использовалась водоросль *Haematococcus pluvialis* (Flot. em. Wille) штамм IBCE H-17 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАНБ, выращенная в накопительном режиме на питательной среде Рудика В.Ф. [4].

Подсчет клеток проводили визуально с помощью камеры Горяева [2]. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре ПЭ-6400ВИ. Спектрофотометрирование проводили в прямоугольной кювете с длиной оптического пути в 1 см при длинах волн 400–510 нм и 620–700 нм с шагом в 10 нм. Для построения калибровочного графика и уравнения регрессии было приготовлено 10 разведений суспензии различной концентрации (таблица 1).

Таблица 1. – Соотношение суспензии гематококка и дистиллированной воды

Номер про-бирки	Количество, мл		Номер про-бирки	Количество, мл	
	Суспензия ге-матококка	Дистиллиро-ванная вода		Суспензия ге-матококка	Дистиллиро-ванная вода
1	10	0	6	5	5
2	9	1	7	4	6
3	8	2	8	3	7
4	7	3	9	2	8
5	6	4	10	1	9

Измерения проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных и регрессионный анализ выполняли с помощью программы MS EXCEL [1].

Результаты исследований и их обсуждение. На основании анализа полученных данных для различных длин волн построены графики линейного роста, определены коэффициенты детерминации и значимость уравнений регрессии ($p=0,05$) (таблица 2).

Таблица 2. – Значения основных статистических параметров

Длина волны, нм	Коэффициент детерминации, R^2	Значимость F	Длина волны, нм	Коэффициент детерминации, R^2	Значимость F
400	0,9233	$9,7870 \times 10^{-6}$	510	0,9652	$4,0489 \times 10^{-7}$
410	0,9200	$1,1563 \times 10^{-5}$	620	0,9520	$1,4766 \times 10^{-6}$
420	0,9416	$3,2485 \times 10^{-6}$	630	0,9662	$3,6285 \times 10^{-7}$
430	0,9694	$2,4181 \times 10^{-7}$	640	0,9787	$5,7113 \times 10^{-8}$
440	0,9591	$7,7676 \times 10^{-7}$	650	0,9622	$5,6445 \times 10^{-7}$
450	0,9405	$3,5064 \times 10^{-6}$	660	0,9663	$3,5664 \times 10^{-7}$
460	0,9612	$6,3011 \times 10^{-7}$	670	0,9886	$4,6765 \times 10^{-9}$
470	0,9661	$3,6807 \times 10^{-7}$	680	0,9181	$1,2702 \times 10^{-5}$
480	0,9582	$8,5139 \times 10^{-7}$	690	0,9029	$2,5278 \times 10^{-5}$
490	0,8884	$4,4520 \times 10^{-5}$	700	0,9207	$1,1201 \times 10^{-5}$
500	0,9761	$9,0704 \times 10^{-8}$			

Взаимосвязь между численностью клеток, подсчитанной методом микроскопирования и оптической плотностью суспензии, определенной спектрофотометрическим методом, в полной мере отражают уравнения регрессии. На основании показателя значимости F можно сделать вывод, что для всех длин волн уравнения линейной регрессии достоверны, однако самый высокий коэффициент детерминации отмечен при измерении на длине волны 670 нм (0,99). Уравнение регрессии при измерении на данной длине волны оптической плотности суспензии *H. pluvialis* также значимо (уровень значимости F был равен $4,68 \times 10^{-9}$) и имеет следующий вид (формула 1):

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 0,6386 \times \text{ОП}_{670} - 0,8364 \quad (R^2=0,99; p<0,05) \quad (1)$$

где ОП_{670} – значение оптической плотности суспензии при 670 нм.

Коэффициенты данного уравнения регрессии также были статистически значимы (при $p=0,05$): $a_0=0,0001$, $a_1=4,6765 \times 10^{-9}$.

Заключение. При культивировании *H. pluvialis* возможно применение спектрофотометрического метода для определения численности клеток взамен подсчета клеток под микроскопом в счетной камере. При этом оптическую плотность следует измерять при длине волны 670 нм, а для вычисления количества клеток использовать уравнение: Количество клеток (млн. кл/мл) = $0,6386 \times \text{ОП}_{670} - 0,8364$.

Таким образом, применение спектрофотометрического метода при культивировании *H. pluvialis* для определения численности клеток позволит снизить трудоемкость процесса культивирования и повысить эффективность контроля параметров роста водоросли.

Список использованных источников

1. Биометрия в MS Excel : учебное пособие / Е. Я. Лебедево [и др.]. – СПб. : Лань, 2020. – 172 с.
2. Владимирова, М. Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей : (инструкция по первичным испытаниям, выделяемых из природы и селекционируемых форм фотоавтотрофных одноклеточных водорослей) / М. Г. Владимирова, В. Е. Семененко ; Акад. наук СССР, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева. – М. : АН СССР, 1962. – 59 с.
3. Накопление астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*, индуцированное дефицитом азота и светом высокой интенсивности / Т. В. Самович [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2020. – № 3. – С. 37–45.

4. Сохранение и воспроизведение хозяйственно полезных видов водорослей в альгологической коллекции : метод. Указ. / Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточ. Инженерии ; [сост.: С. С. Мельников и др.]. – Минск : Право и экономика, 2010. – 40 с.
5. Brian, D. F. Encyclopedia of Ecology / D. F. Brian. – USA: Elsevier, 2018. – 2780 p.
6. Fucoxantin: A Treasure from the Sea / N. D’Orazio [и др.] // Marine Drugs. – 2012. – Vol. 10, № 3. – С. 604–616.
7. Imamoglu, E. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of Haematococcus pluvialis / E. Imamoglu, M. Conk Dalay, V. Fazilet // International Journal of Natural and Engineering Sciences. – 2007. – № 1. – С. 5–9.
8. Michael, A. B. Microalgae in Health and Disease Prevention / A. B. Michael. – USA: Academic Press, 2018. – 345 p.
9. Ravishankar, G. A. Global Perspectives on Astaxanthin From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications, 1st edition / G. A. Ravishankar , A. Ranga Rao Rao. – Academic Press, 2021. – 824 p.