

СПЕКТРОФОТАМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК В СУСПЕНЗИИ ВОДОРΟΣЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

В.Р. Макаревич, 3 курс

Научный руководитель – **Н.П. Дмитрович**, к.с.-х.н., доцент

Полесский государственный университет

В течение последних лет *Haematococcus pluvialis* стал объектом повышенного интереса как источник для производства астаксантина. В настоящее время проводятся исследования, цель которых – выявить механизмы синтеза астаксантина в *H. pluvialis* [1, с. 1].

Haematococcus pluvialis – редкая пресноводная одноклеточная зеленая водоросль с комплексным жизненным циклом [2, с. 71]. Из всех естественных источников она является уникальным производителем астаксантина (розового каротиноида), который широко применяется в качестве биологически активной добавки в пищу, а также в косметике и фармацевтике [3, с. 29]. В настоящее время проводятся многочисленные исследования, которые подтверждают, что астаксантин благоприятно влияет на иммунную реакцию, работу сердечно-сосудистой системы. Его применение позволяет снизить риск развития онкологических и кожных заболеваний, сахарного диабета.

Кроме того астаксантин широко применяется в качестве пигмента в кормах для животных, в основном в аквакультуре лосося, форели и креветок, а также у домашней птицы для улучшения окраски яичного желтка [4, с. 17].

Процесс биосинтеза астаксантина в клетках гематококка, как правило, сопровождается превращением овальных зеленых вегетативных клеток водоросли в красные цисты. Данный процесс происходит в большинстве случаев в условиях стресса при недостатке питательных веществ, повышенной солевой концентрации, высоких температурах в сочетании с интенсивным освещением, что приводит к увеличению накопления каротиноидов преимущественно в эфироизомерированной форме [2, с. 71; 3, с. 29] и сопровождается изменением цвета суспензии.

Исходя из этого цель исследований – определение зависимости между оптической плотностью суспензии водоросли красного цвета и количеством клеток в процессе культивирования.

В качестве объекта исследований использовалась водоросль *Haematococcus pluvialis* (Flot. em. Wille) штамм ИВСЕ Н-17 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАНБ, выращенная в накопительном режиме на питательной среде Рудика. Подсчет клеток проводили визуально с помощью камеры Горяева. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре ПЭ-6400ВИ. Спектрофотометрирование проводили в прямоугольной кювете с длиной оптического пути в 1 см при длинах волн 400–540 нм и 660–710 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 пробирки	Количество, мл		Номер пробирки	Количество, мл	
	Суспензия гематококка красного цвета	Дистиллированная вода		Суспензия гематококка красного цвета	Дистиллированная 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

Все измерения проводили в трехкратной повторности [5, с. 249]. Статистическую обработку данных и регрессионный анализ выполняли с помощью программы MS EXCEL [6].

На основании анализа полученных данных для различных длин волн были определены коэффициенты детерминации и значимость уравнений регрессии при $p=0,05$ (таблица 1).

Таблица 2. – Значения основных статистических параметров регрессионного анализа

Длина волны, нм	Коэффициент детерминации, R ²	Значимость F	Длина волны, нм	Коэффициент детерминации, R ²	Значимость F
400	0,8729	2,2472×10 ⁻⁴	510	0,7463	2,6739×10 ⁻³
410	0,6658	7,3133×10 ⁻³	520	0,8604	3,1370×10 ⁻⁴
420	0,6118	1,2734×10 ⁻²	530	0,9042	8,2466×10 ⁻⁵
430	0,8179	8,1016×10 ⁻⁴	540	0,8481	4,2320×10 ⁻⁴
440	0,9818	2,3672×10 ⁻⁷	660	0,9792	3,7843×10 ⁻⁷
450	0,3371	1,0117×10 ⁻¹	670	0,8144	8,6773×10 ⁻⁴
460	0,4739	4,0323×10 ⁻²	680	0,7195	3,8511×10 ⁻³
470	0,7679	1,9377×10 ⁻³	690	0,9116	6,1936×10 ⁻⁵
480	0,9922	1,2361×10⁻⁸	700	0,7623	2,1122×10 ⁻³
490	0,2908	1,3409×10 ⁻¹	710	0,8986	1,0054×10 ⁻⁴
500	0,7732	1,7845×10 ⁻³			

При длинах волн 450 нм и 490 нм были получены довольно низкие значения коэффициентов детерминации (0,3371 и 0,2908), а значения р были равны 1,0117×10⁻¹ и 1,3409×10⁻¹ соответственно, что свидетельствовало о несоответствии модели линейной регрессии данным, на которых она была построена. Самый высокий коэффициент детерминации был отмечен при измерении длины волны при 480 нм – 0,9922, а значимость F – 1,2361×10⁻⁸, что позволило использовать эти данные для построения уравнения регрессии типа $y=ax+b$. Полученное уравнение имело следующий вид (формула 1):

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 0,2782 \times \text{ОП}_{480} - 0,0277 \quad (R^2=0,99; p<0,05) \quad (1)$$

где ОП₄₈₀ – значение оптической плотности суспензии при 480 нм.

Значение коэффициента а, полученного уравнения регрессии, было равным 1,2361×10⁻⁸, а коэффициента b – 0,0031, что свидетельствовало об их значимости при р=0,05.

Проведенные исследования позволили выявить длину волны для последующего применения спектрофотометрического метода для определения количества клеток *H. pluvialis* в суспензии красного цвета в фазе роста водоросли, соответствующей процессу накопления красных пигментов, в том числе и астаксантина. Построенное уравнение регрессии обеспечит уменьшение трудоемкости процесса культивирования водоросли за счет замены классического метода подсчета клеток под микроскопом в счетной камере на спектрофотометрический с измерением оптической плотности суспензии красного цвета при длине волны 480 нм.

Список использованных источников

1. Yongni, S. Study on the Visualization of Pigment in Haematococcus pluvialis by Raman spectroscopy Technique / G. Weimin, J. Linjun, Z. Yiming, G. Aiping // Scientific Reports. – 2019. – №9. – 1 p.
2. 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.
3. Вязов, Е. В. Пигментный состав зеленой водоросли *Haematococcus pluvialis* в условиях действия нескольких индикаторов накопления астаксантина / Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик, Е. А. Куликов, А. А. Селищева // Гос. н. уч. «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси». – 2020. – Т36, №4. – С. 29–33.
4. Kiperstok, A. C. Optimizing immobilized cultivation of Haematococcus pluvialis for astaxanthin production: dis. ... offen. matte. isst wissenschaften: 12.04.16. / A. C. Kiperstok/ – Brasilien, 2016. – 128 p.
5. Макаревич, В. Р. Применение спектрофотометрического метода для определения количества клеток в суспензии водоросли *Haematococcus pluvialis* / В. Р. Макаревич, А. А. Казимирчик, Н. П. Дмитриевич // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XVII международной молодежной научно-практической конференции, УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, 14 апр. 2023 г.: в 2 ч. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2023. – Ч. 2. – С. 249–251.

6. Биометрия в MS Excel : учебное пособие / Е. Я. Лебедько, А. М. Хохлов, Д. И. Барановский, О. М. Гетменец. – СПб. : Лань, 2020. – 172 с.