

## Применение цифровой фотометрии для контроля количественных показателей в культуре микроводорослей *in vivo*

© В.А. Богатырев<sup>1,2</sup>, Д.А. Пузанов<sup>1</sup>, Л.А. Дыкман<sup>1</sup>, Н.Г. Хлебцов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ „Саратовский научный центр РАН“, Саратов, Россия

<sup>2</sup> Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

e-mail: bogatyrev\_v@ibppm.ru

Поступила в редакцию 29.04.2025 г.

В окончательной редакции 07.10.2025 г.

Принята к публикации 06.03.2026 г.

*Dunaliella* — важный в биотехнологии род микроводорослей, одним из достоинств которого является продукция высококачественного  $\beta$ -каротина. В процессе развития популяций водорослей, особенно при переживании неблагоприятных условий, изменяются размеры и форма клеток, а также содержание основных растительных пигментов — хлорофиллов и каротиноидов. Разработка методов оперативного контроля состояния культуры микроводорослей является актуальной задачей. В работе описан простой метод контроля биомассы и содержания основных растительных пигментов в культурах микроводорослей *D. salina*, основанный на определении мутности суспензии клеток и пигментов в просветленных экстрактах с помощью цифровой фотометрии. Метод цифровой фотометрии основан на анализе изображений в аддитивной цветовой модели RGB и позволяет получать характеристики взвесей в терминах единиц оптической плотности. Измеряемым параметром является интенсивность каналов цветности RGB и общей интенсивности  $H$ , усредненных по выделенной области (лунки планшета) и выраженных в логарифмической форме относительно нулевого сигнала (бланка). Равномерность и постоянство проходящего света при захвате изображения обеспечивается использованием экрана ноутбука как осветителя. Мы показываем, что использование обычного смартфона для цифровой фотометрии обеспечивает выполнение закона Бугера для живых микроводорослей в широком диапазоне концентрации клеток.

**Ключевые слова:** экстинкция, абсорбция, мутность, светорассеяние, оптическая плотность, цифровая фотометрия, хлорофилл, оптическое просветление, микроводоросли, *Dunaliella salina*.

DOI: 10.61011/OS.2026.06.63421.7623-25

### 1. Введение

Микроводоросли являются важным биотехнологическим объектом, поэтому оперативная оценка состояния культуры — биомассы, скорости роста и содержания основных пигментов — является актуальной задачей. Для решения многопараметрических задач оптимизации условий культивирования и биотестирования применяются микропланшетные спектрофотометры и флуориметры [1,2]. В то же время фотокамеры современных смартфонов снабжены универсальным фотоприемником с трехполосным монохроматизатором в виде широкополосных светофильтров ПЗС-матрицы [3]. Поэтому измерения аналитического сигнала с помощью бытовых цифровых оптических устройств (смартфонов и офисных сканеров), не сертифицированных в качестве средств измерения, находят все более широкое применение в аналитической химии и смежных областях [4–13].

Методы, основанные при использовании цифровых камер смартфонов, можно назвать цифровой фотометрией (ЦФ) или цифровой колориметрией в соответствии с принятой в англоязычной литературе терминологией digital-image photometry или digital image colorimetry. Близкое по идеологии направление работ, названное

цифровой цветометрией, развито в МГУ школой проф. В.М. Иванова [14–16]. Обзор современного состояния и перспектив развития метода цифровой цветометрии при использовании смартфона в качестве регистрирующего устройства в аналитической химии представлен в работе [17]. Основным направлениям применения смартфонов как детекторов в биомедицинских исследованиях посвящен обзор [18].

Хотя для окрашенных растворов ЦФ хорошо разработана, она гораздо менее исследована в тех случаях, когда анализируемая система представляет собой суспензию частиц, обладающих и поглощением, и сильным рассеянием вперед. Типичным представителем объектов такого рода является *Dunaliella salina* — популярная микроводоросль для производства  $\beta$ -каротина. Важной задачей является селекция штаммов и оптимизация условий роста для максимального производства каротиноидов. Некоторые штаммы не являются каротиногенными, в то время как другие штаммы могут по-разному реагировать на условия роста и продуцировать повышенные уровни каротиноидов [19].

С точки зрения оптики рассеивающих дисперсных систем суспензии микроводорослей представляют собой мутные поглощающие взеси. Обычные спектрофото-

метры, рассчитанные на измерение коллимированного пропускания, в разной степени оценивают долю ослабления (экстинкции) света за счет истинного поглощения частицами и интегрального рассеяния во всех направлениях, кроме рассеяния вперед в пределах апертуры фотоприемника. Из-за рассеяния вперед измеряемая экстинкция всегда является заниженной и не равна ни истинному поглощению, ни сумме поглощения и интегрального рассеяния. Эта проблема имеет давнюю историю, начиная с первых работ по общим вопросам турбидиметрии частиц с сильным рассеянием вперед [20,21] и цикла классических биофизических работ Латимера по турбидиметрии клеточных взвесей [22–25]. Система „линза-щель“ [20,21], в которой апертурная диафрагма фотоприемника помещается в фокусе длиннофокусной линзы, позволяет сделать угол приема очень малым и существенно снизить искажения измеряемой экстинкции. Более того, даже коммерческие спектрофотометры типа Specord M-40 могут быть адаптированы для спектротурбидиметрии клеточных взвесей с помощью специальной приставки и нестандартной схемы измерения [26]. Однако для цифровых фотометров, использующих смартфоны для анализа клеточных взвесей с размерами клеток более  $3\text{--}5\ \mu\text{m}$ , вопрос об адекватности спектральных измерений экстинкции и о выполнении закона Бугера не был, насколько нам известно, изучен. Собственно это и есть предмет настоящей работы. Более точно, целью работы является применение ЦФ для оперативного определения биомассы и содержания основных пигментов в суспензиях микроводорослей по характеристикам мутности и поглощения нативных и просветленных взвесей, а также их экстрактов.

Сделаем еще несколько важных замечаний по данному вопросу. Наиболее адекватной оценкой биомассы суспензий микроводорослей является характеристика их мутности. Однако, как уже говорилось выше, турбидиметрические измерения на спектрофотометрах с классической оптической схемой могут давать различные результаты даже для одного прибора в зависимости от положения кюветы по отношению к фотоприёмнику. Кроме того, прямое фотометрическое определение концентрации пигментов даже в гомогенной суспензии микроводорослей затруднено по двум причинам. Во-первых, хлорофиллы входят в состав белково-пигментного комплекса фотосинтетической антенны. Их коэффициенты экстинкции в нативных условиях зависят от большого количества факторов, в том числе от молекулярной организации антенны, структурной организации тилакоидов, физиологического состояния растений и даже от условий освещённости. Во-вторых, имеется неконтролируемое влияние светорассеяния на результаты измерений за счет изменения размеров клеток и их показателя преломления. Тем не менее представляется важным проведение сравнительных измерений различных образцов, находящихся в одинаковых условиях, если измерения проводить одновременно съёмкой на один кадр. Более того, в серии последовательных кадров можно проследить кинетику процесса. По сути речь идёт об оценке

оптической плотности изображения, формируемого при фоторегистрации. По отношению к микроводорослям поставленная задача формулируется так: „можно ли с помощью смартфона оценить изменения основных параметров популяции микроводорослей в культуре, таких как биомасса и содержание основных растительных пигментов хлорофилла и каротиноидов“?

В настоящей работе мы оцениваем долю мутности и поглощения, используя спектрофотометры с различной апертурой приема и оптическое просветление суспензии физиологически нейтральными жидкостями с относительно высоким показателем преломления. Хроматические изменения, обусловленные вариацией пигментного состава, мы оцениваем стандартным спектрофотометрическим способом в экстрактах, дополненным методом оптического просветления. Мы показываем, что лучшие результаты по оптическому просветлению суспензий микроводорослей дает физиологически малоактивная жидкость с высоким показателем преломления ПЭГ-400. Наконец, мы демонстрируем, что данные ЦФ для исследованной клеточной системы согласуются с законом Бугера и малопроизводительными измерениями на стандартных спектрофотометрах.

## 2. Методы

### 2.1. Поддержание культур микроводоросли

Культура микроводорослей *D. salina* Teod. IP-PASD-294 была получена из коллекции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва (ИФР РАН). Для наращивания биомассы использовали культуральную среду (СМ) Бен-Амотца (ВА) [27] с  $1.5\ \text{M NaCl}$  при комнатной температуре ( $21\text{--}24^\circ\text{C}$ ) при естественном дневном свете. Подробнее методика поддержания и выращивания культур описана в нашей более ранней работе [28].

Стандартно культура клеток *D. salina*, поддерживаемая в псевдотурбидистатном режиме (полуобновление среды 1 раз в месяц) имеет концентрацию клеток  $(5.4 \pm 1.0) \times 10^6\ \text{mL}^{-1}$  по данным счетчика клеток TC-20 BioRad (США). Содержание биомассы при этом составляет  $3.6 \pm 0.2\ \text{mg/mL}$  по определению гравиметрическим способом после седиментационного осаждения  $1000\ \text{g}$ ,  $5\ \text{min}$ . Содержание основных пигментов составляет: хлорофилл *a* —  $12.4 \pm 0.04\ \mu\text{g/mL}$ , хлорофилл *b* —  $4.68 \pm 0.009\ \mu\text{g/mL}$ , каротиноиды —  $7.29 \pm 0.02\ \mu\text{g/mL}$  по определению в спиртовых экстрактах спектрофотометрическим способом.

### 2.2. Статистическая обработка

Все разведения и измерения проводили в дублированных рядах. В качестве результатов приводятся средние значения и абсолютные величины разности измерений в двух рядах в качестве меры среднеквадратической ошибки. В экспериментах с линейными разведениями

на графиках мы приводим линейные аппроксимации. Соответствующие коэффициенты детерминации  $R^2$ , как правило, превышали 0.95.

### 2.3. Спектрофотометрические измерения

Спектрофотометрические измерения проводили на микропланшетном спектрофотометре BioTek Epoch 2 (Agilent, США) в режиме регистрации спектра 400–750 nm с шагом 4 nm, VIS-спектрофотометре Specord S-300 и UV-VIS-спектрофотометре Specord S-600 в том же диапазоне длин волн с шагом 0.5 nm. Длина оптического пути в ячейках 96- 48-, 24-луночных планшетов составляет по геометрическим параметрам ячеек 6.2, 5.7, 10.8 nm соответственно при заполнении лунок объемами 200, 500 и 2000  $\mu\text{L}$ . Реальные толщины оптических слоев могли отличаться за счет влияния менисков.

### 2.4. Калибровка и цифровые фотометрические измерения

Для стандартизации фотометрических измерений несертифицированным оборудованием была изготовлена „фотометрическая линейка“, представляющая собой ряд разведений нейтрально-серой краски — чернил для струйного принтера. В лунке 6-луночного планшета к 5 mL воды mQ (Milli-Q) постепенно добавляли чернила для струйных принтеров, контролируя оптическую плотность на планшетном спектрофотометре: Yellow (10  $\mu\text{L}$ ), Magenta (15  $\mu\text{L}$ ) и Blue (8.75  $\mu\text{L}$ ). В скобках указаны количества, дающие максимально регистрируемые в пиках значения ( $\approx 4$ ) на микропланшетном спектрофотометре. Затем в лунки одного ряда 48-луночного планшета вносили 1.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125 и 0.06 mL смеси и дополняли водой до 1.5 mL. Регистрировали спектр поглощения 400–750 nm с шагом 10 nm на микропланшетном спектрофотометре BioTek Epoch 2.

Для ЦФ-измерений проводили фотосъемку планшетов, помещенных на белый экран ноутбука, закрытых картонным светонепроницаемым коробом во избежание паразитных засветок. Основные результаты были получены на камеру смартфона Redmi Note 12 (Android) в профессиональном режиме с постоянными настройками: цветовая температура 6000 K, выдержка 1/60 s, чувствительность 400 ISO, диафрагма (светосила)  $f/1.8$ . Съемку осуществляли с расстояния 60 cm, располагая планшеты на экране ноутбука (белый свет с максимальной яркостью) в светозащитном коробе.

Для выяснения возможных аппаратных ограничений применимости метода фотометрическую линейку снимали на один кадр с рядом нативных и просветленных взвесей и экстрактов. В эксперименте участвовали 4 смартфона производителей Apple, Samsung и Xiaomi (2 разные модели). Съемку производили при полностью автоматических настройках камер.

Альтернативно фотометрическую калибровку фотокамер проводили с использованием нейтральных свето-

фильтров HC8 толщиной 1 и 4 mm. Для сравнения использовали усредненные по всем длинам волн диапазона 400–700 nm значения оптической плотности спектра, полученного на спектрофотометре Specord S 600.

### 2.5. Обработка изображений

Обработку изображений проводили с помощью программ Image J и Excel. В программе Image J открывали файл с изображением в формате \*.jpg и с помощью инструмента „гистограмма“ во вкладке „анализ“ получали значения измеряемого канала цвета  $V(R)$ ,  $V(G)$ ,  $V(B)$ , или общей интенсивности  $V(H)$ , усредненные по площади выделения (области интереса, выделенной на изображении). Значения оптической плотности рассчитывали по формуле

$$OD(RGB)_i = \ln[V(RGB)_0/V(RGB)_i], \quad (1)$$

где  $V(RGB)_0$  — значение уровня цветности канала лунки бланка (без пробы), а  $V(RGB)_i$  — значение того же канала  $i$ -й лунки. Аналогичный расчет проводили для общей оптической плотности. Нормализованные на величины стандартов значения оптической плотности получали, деля измеренные значения проб на коэффициент линейной аппроксимации ЦФ для стандартных образцов (фотометрической линейки).

### 2.6. Определение содержания растительных пигментов

Содержание пигментов (хлорофиллов  $a, b$  и каротиноидов) в спиртовых экстрактах определяли по формулам [29]

$$Chl_a(\mu\text{g/mL}) = 12.21A_{665} - 2.81A_{649}, \quad (2)$$

$$Chl_g(\mu\text{g/mL}) = 20.13A_{649} - 5.03A_{665}, \quad (3)$$

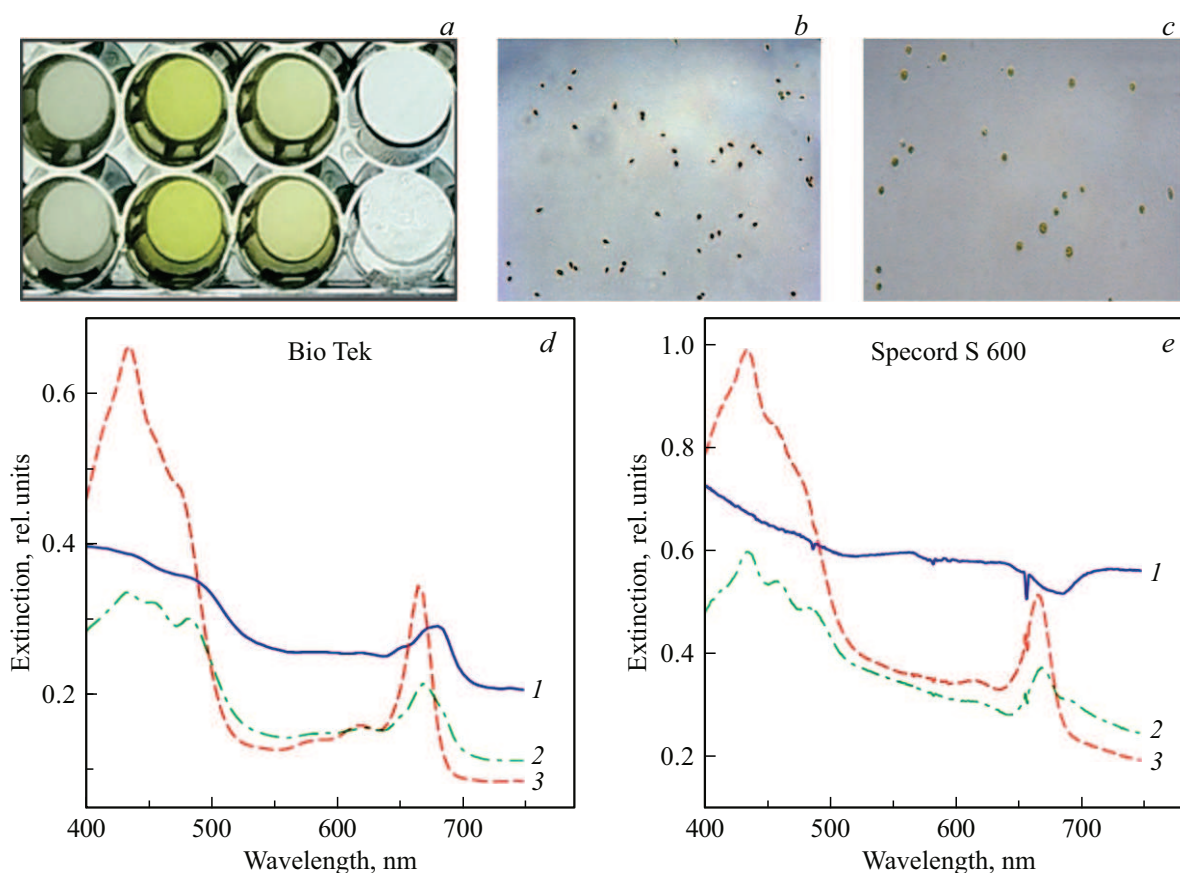
$$Car_a(\mu\text{g/mL}) = \frac{1000A_{470} - 3.27A_{665} - 104A_{649}}{227}, \quad (4)$$

где символами  $A_{665}$  и т. д. обозначены поглощения в 1 cm кювете на соответствующей длине волны.

### 2.7. Порядок разведения и оптическое просветление

Для иммерсионного оптического просветления взвесей микроводоросли использовали физиологически инертную жидкость полиэтиленгликоль 400 Da (ПЭГ-400). Для сравнительных измерений на разных спектрофотометрах в лунки 48-луночного планшета вносили по 0.25, 0.5, 0.75, 1 и 1.25 mL культуры микроводоросли и доводили до объема 1.25 mL CM BA. Аналогично в лунки такого же планшета вносили по 0.25 mL культуры микроводоросли и добавляли по 0.25, 0.5, 0.75 или 1 mL ПЭГ-400.

Для сравнения оптических свойств живых и оптически просветленных взвесей, а также спиртовых экстрактов в



**Рис. 1.** (а) Фрагмент 48-луночного планшета с дублированными рядами лунок с суспензией живых микроводорослей в СМ, просветленный PEG 400 спиртовой экстракт этой взвеси (PEG 400 EtOH) и просветленная PEG 400 взвесь. Четвертая лунка пустая. Микрофотографии нативной (b) и просветленной (c) взвеси. Спектральные зависимости суспензий живых микроводорослей в разных средах: СМ (1); PEG 400 (2) и PEG 400 EtOH (3), полученные на спектрофотометрах BioTek (d) и Specord S 600 (e).

лунки 48-луночного планшета вносили по 250  $\mu\text{L}$  взвеси микроводорослей, по 500  $\mu\text{L}$  96% этилового спирта (EtOH) и 500  $\mu\text{L}$  ПЭГ-400 с перемешиванием пипеткой. После 5 min инкубации в темноте проводили фотосъемку и измерения на BioTek Epoch 2.

Все измерения проводили в дублированных рядах, в случае подозрения на случайные ошибки количество повторностей увеличивали.

### 3. Результаты и обсуждение

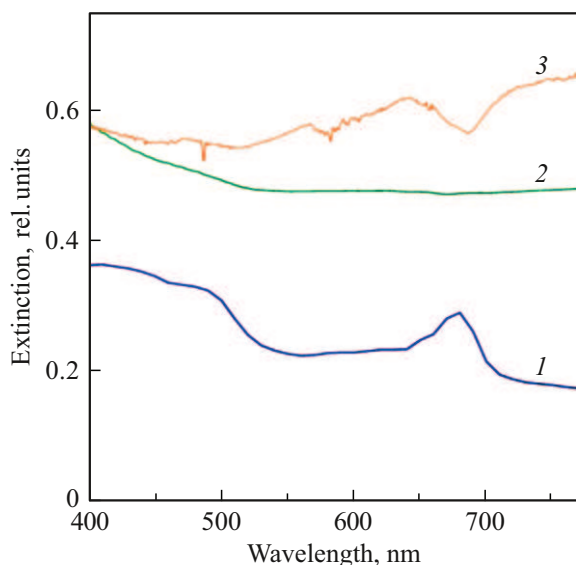
На рис. 1 приведено изображение фрагмента планшета с дублированными рядами лунок, в которых слева направо внесены: суспензия живых микроводорослей в культуральной среде (СМ), просветленный PEG 400 спиртовой экстракт этой взвеси (PEG 400 EtOH) и просветленная PEG 400 взвесь (рис. 1, a); микрофотографии нативной (рис. 1, b) и просветленной (рис. 1, c) взвеси; спектральные зависимости взвесей (экстрактов), полученные на спектрофотометрах BioTek (рис. 1, d) и Specord S 600 (рис. 1, e).

Из рис. 1, d, e следует, что спектры экстрактов, зарегистрированные на планшетном и обычном спектрофо-

тометре, качественно совпадают, но имеются заметные количественные различия в величине пиков — на планшетном спектрофотометре они существенно занижены. Что же касается спектров нативной взвеси клеток, то соответствующие спектры даже качественно различаются. Именно, в то время как на СМ спектре (d) виден ожидаемый пик хлорофилла на 680 nm, на спектре (e) наблюдается провал в этой области. Этот пример наглядно демонстрирует, что даже сертифицированные приборы могут давать совершенно разную спектральную информацию в случае сильно рассеивающих клеток с поглощающими пигментами. И даже в случае окрашенных растворов различия в измеренных пиках поглощения могут достигать 30–50% в зависимости от типа прибора.

Критическую зависимость регистрируемых спектров оптической плотности суспензии микроводорослей от апертуры приема спектрофотометра демонстрирует измерение спектров экстинкции одной и той же взвеси в кювете толщиной 2 mm, полученных на разных приборах BioTek, Specord S-300 и Specord S-600 в стандартных условиях (рис. 2).

Аналогичные результаты мы показывали ранее [30,31]. Очевидно, что сопоставление результатов измерений не



**Рис. 2.** Спектры экстинкции суспензии живых микроводорослей *D. salina* D 294, измеренные на спектрофотометрах BioTek (1), S 300 (2) и S 600 (3).

представляется возможным ни по мутности, регистрируемой на длине волны 750 nm ( $E_{750}$ ), ни по величине пика хлорофиллов  $E_{680-750} = E_{680} - E_{750}$ , поскольку кривые спектров имеют принципиально различный характер. Область поглощения хлорофиллов проявляется в виде небольших пиков различной интенсивности для микропланшетного спектрофотометра BioTek и Vis-спектрофотометра Specord S 300 и в виде провала для UV-Vis-спектрофотометра Specord S 600. При этом общий вид зависимости имеет степенной характер и похож на спектры светорассеяния, регистрируемые с помощью спектрофотометров с интегрирующей сферой, однако сильно отличается от спектров экстинкции, регистрируемых с помощью тех же спектрофотометров [32,33].

Причины указанных различий связаны с особенностями рассеяния и поглощения света крупными клетками микроводорослей, впервые продемонстрированными в работе [34] и названные селективным рассеянием. С физической точки зрения поглощающие пигменты в клетках действуют как селективные фильтры с полосами поглощения каротиноидов ( $\sim 470$  nm) и хлорофиллов ( $\sim 680$  nm), в то время как рассеяние крупными клетками подчиняется известному степенному закону  $\lambda^{-n}$  с „волновым экспонентом“ (область аномальной дифракции с малым фазовым сдвигом [35]). В результате рассеяние демонстрирует селективный пик около 700 nm, сдвинутый в красную область [36]. Для выявления отдельных вкладов рассеяния и поглощения в регистрируемый спектр экстинкции разработаны специальные методы [25,37,38].

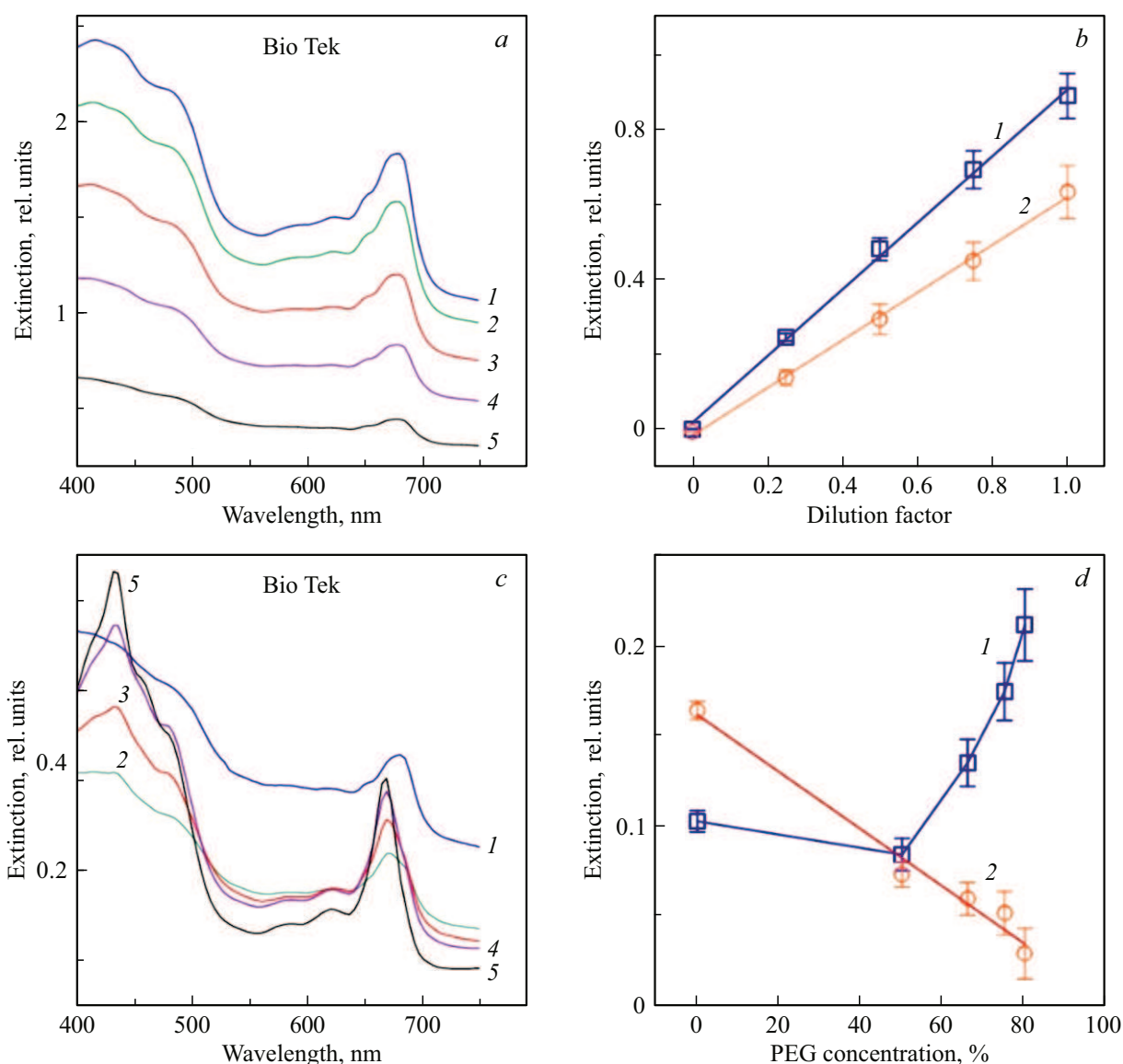
Поскольку размеры клеток водорослей на один-два порядка превышают длину волны света, их индикатриса рассеяния сильно вытянута вперед (эффект Ми). По-

этому для корректного измерения спектров экстинкции нужно использовать или фотометрическую схему типа линза-щель с малой апертурой приема или фотометры с интегрирующей сферой. В идеале лучше всего использовать комбинацию этих приборов для отдельного детектирования спектров коллимированной экстинкции и спектров полного отражения от интегрирующей сферы. Как видно из рис. 2, обычные планшетные спектрофотометры или однолучевые приборы типа Specord S-300, S-600 не пригодны для корректных измерений даже спектров экстинкции.

Для выяснения вклада рассеяния вперед в искажение измеряемого спектра экстинкции можно использовать два подхода: (1) изменять апертуру приема, (2) уменьшать вклад светорассеяния самих клеток за счет эффекта оптического просветления [39], когда показатель преломления среды становится близким к реальной части среднего показателя клеток. В настоящей работе мы использовали второй подход, проведя измерения в ряду иммерсионных сред с изменяемым показателем преломления — растворов ПЭГ-400 ( $n^{20D} = 1.468$ ) 50%, 66%, 75% и 80% на спектрофотометрах BioTek (рис. 3) и Specord S 600 (рис. 4).

Отсутствие различий в регистрируемых планшетным спектрофотометром спектрах при разведении взвеси СМ проявляется в практически абсолютно линейной зависимости от степени разведения общей мутности  $E_{750}$  и величины красного пика хлорофиллов  $E_{680-750} = E_{680} - E_{750}$  (рис. 3, b). Совершенно другая трансформация спектров экстинкции наблюдается на рис. 3, c при оптическом просветлении иммерсионными растворами ПЭГ. При максимальной концентрации ПЭГ четко выявляется пик поглощения хлорофиллов и каротиноидов в синей области около 420 nm и относительное увеличение пика хлорофиллов (в красной области) с одновременным смещением в синюю область при увеличении концентрации ПЭГ. Зависимость мутности и величины пика хлорофиллов от разведения приобретает нелинейный характер, поскольку с разведением возрастает показатель преломления дисперсионной среды. Как известно [35], в области аномальной дифракции сечение рассеяния  $\rho$  частицы с радиусом  $R$  сложным образом зависит от фазового сдвига, пропорционального разности показателя преломления частицы и среды  $\rho = (4\pi R/\lambda)(n - n_m)$ . В частности, для малых фазовых сдвигов (прозрачные частицы)  $\rho^2 \sim (n - n_m)^2$ .

В случае разведения клеточной суспензии СМ характер спектров, регистрируемых прибором S-600 (рис. 4, a), не изменяется, изменяется только общий уровень экстинкции с необычным провалом около 680 nm. Сигнал общей мутности  $E_{750}$  линейно зависит от степени разведения (рис. 4, b). Однако для просветленных образцов при добавлении иммерсионной среды наблюдаются более существенные изменения спектров (рис. 4, c) по сравнению с изменениями, регистрируемыми на планшетном спектрофотометре (рис. 3, c). Самым интересным наблюдением в эволюции спектров экстинкции про-

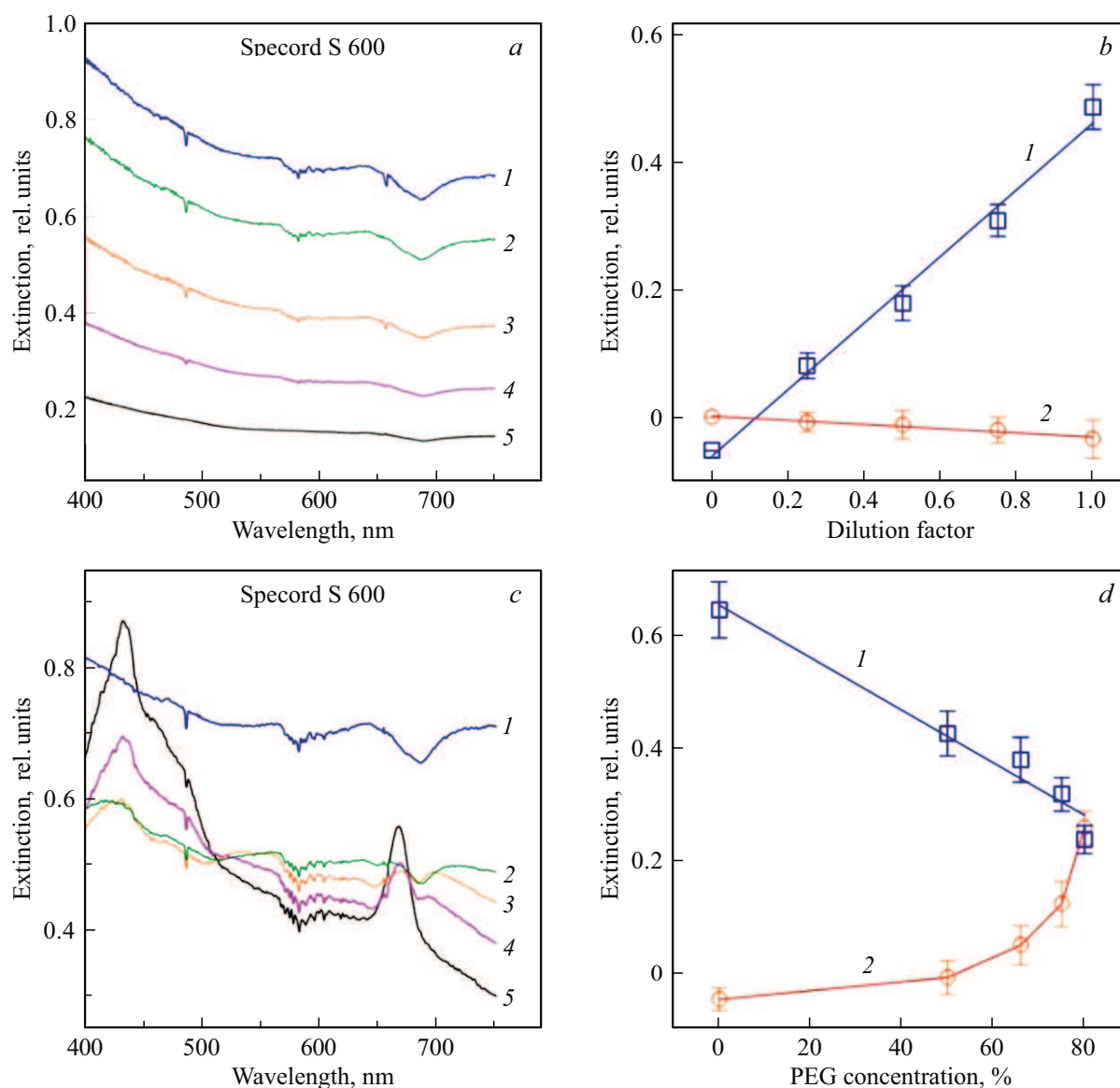


**Рис. 3.** Спектры экстинкции суспензии живых микроводорослей *D. salina* D 294, измеренные на микропланшетном спектрофотометре BioTek в серии разведений с шагом 25% СМ (a) или PEG 400 (c), кривые 1–5; 1 — исходный образец. Зависимости экстинкции  $E_{750}$  (1) и  $E_{680-750}$  (2) от фактора разведения  $DF = V_{int}/V_{fn}$  СМ (b) и от концентрации PEG 400 (d). Прямые — линейные аппроксимации, соответствует СМ. Вертикальные отрезки — величины стандартных отклонений.

светленных суспензий в концентрационном ряду ПЭГ-400 от 50 до 80% является инверсия кривых с четкой локализацией пиков поглощения хромофоров, которые не наблюдаются на исходных спектрах. Для просветленных образцов величина рассеяния, как объяснялось выше, существенно уменьшается, и прибор начинает регистрировать спектр, определяемый поглощением пигментов. Поэтому виден не только пик поглощения хлорофиллов и каротиноидов в синей области, но и пик поглощения хлорофиллов в красной области вместо наблюдаемого провала в исходном образце. Этот пример наглядно показывает физическую причину искажения спектров экстинкции за счет рассеяния в апертуру приемника. С другой стороны, этот же эксперимент показывает, что

даже с такими приборами можно получить более или менее корректный спектр поглощения суспензии, если применить технологию оптического просветления. Эта технология может сделать возможным прямое спектрофотометрическое определение концентрации растительных пигментов с оговоркой на зависимость коэффициентов экстинкции пигментов от локального молекулярного окружения.

Следует отметить, что степенной характер кривых ослабления, регистрируемых спектрофотометром S-600, позволяет сделать хороший прогноз на использование фотокамеры смартфона для регистрации мутности суспензий микроводорослей с возможно большого расстояния, что, кроме прочего, снижает искажающее влияние



**Рис. 4.** Спектры экстинкции суспензии живых микроводорослей *D. salina* D 294, измеренные на микропланшетном спектрофотометре Specord S 600 в серии разведений с шагом 25% СМ (а) или PEG 400 (с), кривые 1–5; 1 — исходный образец. Зависимости экстинкции (1) и (2) от фактора разведения  $DF = V_{\text{int}}/V_{\text{in}}$  СМ (b) и от концентрации PEG 400 (d). Прямые — линейные аппроксимации, соответствует СМ. Вертикальные отрезки — величины стандартных отклонений.

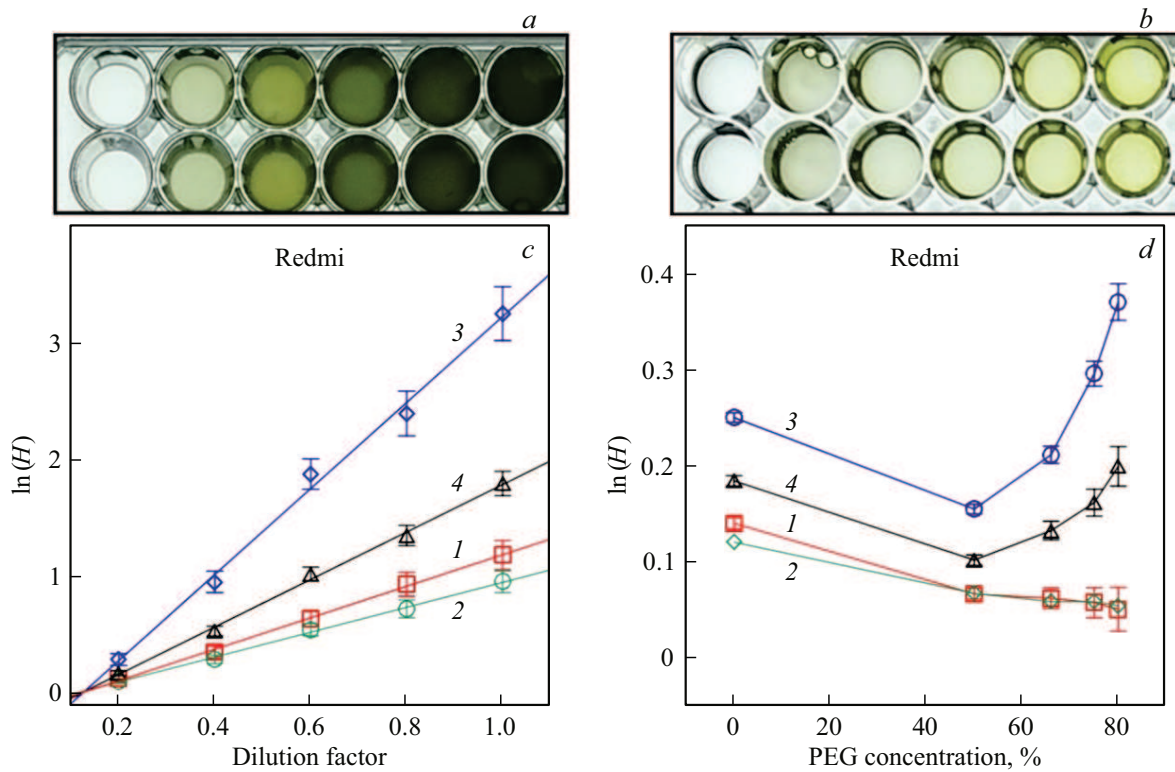
фотографического параллакса. На рис. 5, а, b показаны фрагменты 48-луночных планшетов с дублированными рядами последовательных линейных разведений СМ или ПЭГ-400. Первые колонки лунок заполнены соответствующей средой и используются в качестве бланка.

При разведении микроводорослей СМ средой наблюдается строго линейный характер зависимости регистрируемого сигнала по всем цветовым каналам вплоть до коэффициентов ослабления  $\ln(H/H_{\text{blank}})$  порядка 3 аналогично другим спектрофотометрам, демонстрируя хорошее соблюдение закона Бугера (рис. 5, с). Изменения сигнала, регистрируемые камерой смартфона

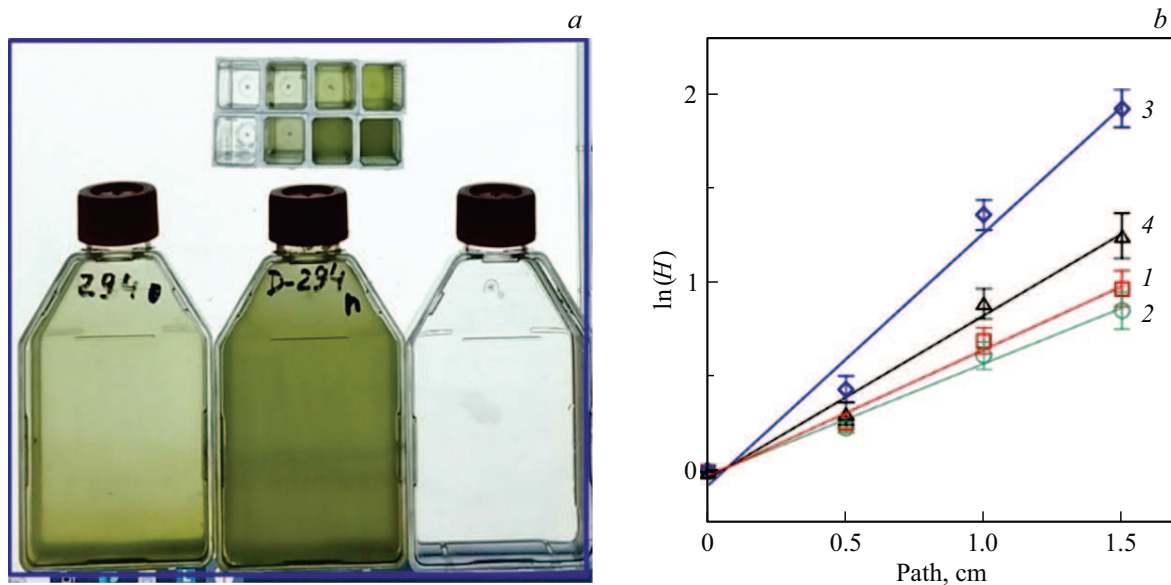
в просветленных взвесах, аналогичны измерениям на спектрофотометре Specord S 600.

Другим доказательством адекватности измерений методом ЦФ является достаточно линейная зависимость экстинкции от толщины оптического слоя (рис. 6, а, b).

Можно заметить, что для культуры D 294 хорошая линейность выполняется до оптических плотностей  $\sim 2$ . Выполнение закона Бугера по концентрации и длине оптического пути показывает возможность использования метода ЦФ для оперативной оценки общей биомассы в культуре микроводоросли. В случае выхода значений оптической плотности за пределы линейного участка динамического диапазона для регистрации ослабления света методом ЦФ можно использовать



**Рис. 5.** Фотографии фрагмента планшета с рядами разведений суспензии микроводорослей *D. salina* D 294 CM (a) и иммерсионной средой ПЭГ 400 (b). Панели (c) и (d) показывают зависимости коэффициентов ослабления (за вычетом бланка) для цветочных каналов R, G, В (кривые 1–3) и общего сигнала гистограммы *H* (кривая 4) от разведения (c) или концентрации ПЭГ (d). Прямые (c) — линейные аппроксимации. Вертикальные отрезки — величины стандартных отклонений.



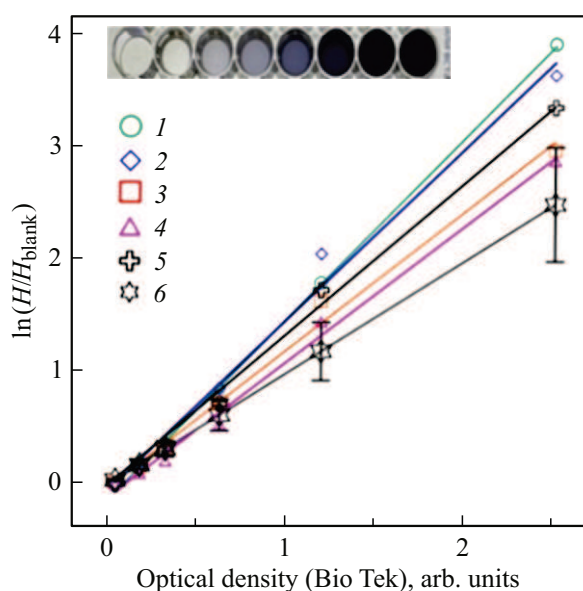
**Рис. 6.** (a) Фотографии флаконов с культурой *D. salina* D 294 и CM и кювет, заполненных на 0,5, 1 и 1,5 см. (b) Зависимости коэффициентов ослабления (за вычетом бланка) для цветочных каналов R, G, В (кривые 1–3) и общего сигнала гистограммы *H* (кривая 4) культуры микроводоросли от толщины оптического слоя. Прямые — линейные аппроксимации.

способ „слоя переменной толщины“ (рис. 7), экстраполируя измерения в тонком слое на весь объем суспензии.

Одной из целей настоящего исследования было выяснение возможности простой оценки биомассы микроводорослей по характеристикам мутности суспензии,



**Рис. 7.** Вид флаконов с культурами микроводорослей на наклонном экране монитора ноутбука для реализации способа „слоя переменной толщины“ методом ЦФ сбоку (а) и сверху (b).



**Рис. 8.** Линейная корреляция оптических плотностей, полученных на планшетном спектрофотометре BioTek и методом ЦФ на различных смартфонах: 1 — iPhone 16 Pro, 2 — Redmi 9T, 3 — Samsung SM M32, 4 — Redmi 14 C. 5 — усредненная линейная аппроксимация для всех четырех смартфонов, 6 — нормированная фотометрическая калибровка с вертикальными отрезками — среднеквадратическими отклонениями по всем четырем смартфонам. На вставке показано изображение „фотометрической линейки“ — фрагмента планшета с рядом разведений нейтрально-серой краски.

не зависящей от наличия специального оборудования. Для нормализации условий фотосъемки и оптимизации алгоритма обработки данных была проведена серия денситометрических измерений по аналогии с классической серебряной фотографией. Характеристические функции фотосенсоров различаются не только для камер разных моделей одного производителя, но и для одной и той же камеры в зависимости от настроек и формата вывода данных: RAW или JPEG. Поэтому для стандартизации фотометрических измерений мы

предлагаем использовать метод сравнения. В качестве эталонов можно использовать стандартные нейтральные светофильтры, либо своеобразную „фотометрическую линейку“ — аналог оптического клина Гелдберга — ряд разведения нейтрально-серой краски. На вставке рис. 8 приведен один из вариантов такой „оптической линейки“, выполненной с помощью чернил для струйного принтера. На рис. 8 приведены значения оптических плотностей, регистрируемых камерами четырех различных смартфонов (Samsung SM32, iPhone 16 Pro, Redmi 9T и Redmi 14C) в сравнении с измерениями на микропланшетном спектрофотометре BioTek. Прямыми линиями 1–4 показаны линейные аппроксимации. Измерения в более широком диапазоне оптических плотностей, вплоть до 3.5, показали, что подобные характеристические функции представляют собой s-образные кривые и не имеют прямолинейных участков в отличие от классического серебряного процесса. Прямая 5 показывает усредненную линейную аппроксимацию  $(H) = 1.35 \times OD_{\text{BioTek}}$  для всех четырех смартфонов. Чтобы получить значение оптической плотности исследуемого образца, надо разделить значение, измеренное камерой смартфона с автоматическими настройками, на коэффициент линейной аппроксимации 1.35 „фотометрической линейки“, снятой на один кадр с этим образцом. Коэффициент детерминации такой аппроксимации составил  $R^2 = 0.996$ . Прямая 6 на рис. 8 представляет среднюю калибровку, полученную таким способом, вместе со среднеквадратическими отклонениями по выбранному набору смартфонов. Таким образом, для любого типа смартфона линейная корреляция между измерениями на смартфоне и планшетном спектрофотометре выполняется в практически важном диапазоне оптических плотностей 0–2.5. При этом калибровка любой камеры достаточно проста и может быть выполнена по описанной методике с помощью разведений чернил для струйного принтера. Приведенные на прямой 6 отклонения показывают возможный диапазон ошибок для случайно выбранного смартфона без калибровки по нейтральной фотометрической линейке.

## 4. Заключение

Главным результатом работы является демонстрация возможности регистрации экстинкции светопоглощающих взвесей с помощью смартфонов, дающей сравнимые результаты на приборах различных типов. Основным критерием адекватности измерений было выявление выполнимости закона Бугера для поглощения пигментами и для мутности, обусловленной рассеянием света клетками. Величина достоверности линейной аппроксимации зависимостей оптической плотности, усредненной по всем цветовым каналам, во всех случаях была не хуже 0.99 до значений оптической плотности  $\sim 2$ . Подтверждением адекватности оценки мутности методом ЦФ является линейная зависимость оптической плотности как от концентрации микроводорослей, так и от длины оптического пути при отсутствии системных изменений взвеси. Последнее обстоятельство позволяет проводить неинвазивные измерения практически в любых плоских сосудах. В случае выхода значений за пределы динамического диапазона может быть применен метод „слоя переменной толщины“ — измерения в наклонных сосудах.

Используя измерения в иммерсионных средах, мы показали, что спектры исходных взвесей, существенно искаженные плохо определенным спектральным вкладом рассеяния, трансформируются во вполне адекватные спектры поглощения с характерными пиками каротиноидов и хлорофиллов. С практической точки зрения этот результат открывает путь к количественному определению пигментов в нативных взвешах без использования экстракции или разрушения ультразвуком [40].

## Финансирование работы

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ для Федерального исследовательского центра „Саратовский научный центр РАН“, тема № 121031700141-6.

## Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] A. Solovchenko. *Algal Res.*, **71**, 103071 (2023). DOI: 10.1016/j.algal.2023.103071
- [2] I. Havlik, S. Beutel, T. Scheper, K.F. Reardon. *Energies*, **15** (3), 875 (2022). DOI: 10.3390/en15030875
- [3] А.А. Чапленко, О.В. Моногарова, К.В. Осолок, А.В. Гармай. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **63** (2), 87 (2022).
- [4] S. Feng, D. Tseng, D. Di Carlo, O.B. Garner, A. Ozcan. *Sci. Rep.*, **6**, 39203 (2016). DOI: 10.1038/srep39203
- [5] H. Ceylan-Koydemir, S. Rajpal, E. Gumustekin, D. Karınca, K. Liang, Z. Göröcs, D. Tseng, A. Ozcan. *Sci. Rep.*, **9**, 19901 (2019), DOI: 10.1038/s41598-019-56474-z
- [6] S. Soares, G.L. Donati, F.R.P. Rocha. *Microchem. J.*, **182**, 107938 (2022). DOI: 10.1016/j.microc.2022.107938
- [7] R.D.C. Malho Alves, L.C. Martins, F.R.P. Rocha. *Anal. Methods*, **15** (37), 4964 (2023). DOI: 10.1039/d3ay01250f
- [8] S. Soares, G.M. Fernandes, F.R.P. Rocha. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **168**, 117284 (2023). DOI: 10.1016/j.trac.2023.117284
- [9] S. Zalewski, K. Skarżyński. *Sensors*, **24** (21), 6936 (2024). DOI: 10.3390/s24216936
- [10] Y. Chen, J.-q. Zhang, Z.-h. Chang, T. Wang, M. Hu, Y. Zhang, X.-y. Long. *J. Instrum. Anal.*, **44** (7), 1426 (2025). DOI: 10.12452/j.fxcsxb.241101504
- [11] G. Hassan, Q.A.-N.A.K. Al-Ibady, A.K. Hashim. *AIP Conf. Proc.*, **3169** (1), 040037 (2025). DOI: 10.1063/5.0254172
- [12] M. de Souza Zangirolami, P. Valderrama, O.O. Santos-Junior. *Food Chem.*, **482**, 144106 (2025). DOI: 10.1016/j.foodchem.2025.144106
- [13] R.T.M. Santos, L.C. Martins, S. Soares, F.R.P. Rocha. *Microchem. J.*, **208**, 112543 (2025). DOI: 10.1016/j.microc.2024.112543
- [14] О.В. Моногарова, К.В. Осолок, В.В. Апяри. *Журнал аналитической химии*, **73** (11), 857 (2018). DOI: 10.1134/s0044450218110063 [O.V. Monogarova, K.V. Oskolok, V.V. Apyari. *J. Anal. Chem.* **73** (11), 1076 (2018). DOI: 10.1134/S1061934818110060].
- [15] В.Г. Амелин, З.А.Ч. Шаока, Д.С. Большаков, А.В. Третьяков. *Известия вузов. Химия и химическая технология*, **65** (7), 17 (2022). DOI: 10.6060/ivkkt.20226507.6568
- [16] О.В. Моногарова, К.В. Осолок, В.С. Милькина, А.В. Гармай. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **66** (5), 390 (2025). DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2025-66-5-390-400
- [17] З.А.Ч. Шаока, Д.С. Большаков, В.Г. Амелин. *Журнал аналитической химии*, **78** (4), 317 (2023). DOI: 10.31857/S0044450223030131 [Z.A. Shogah, D.S. Bolshakov, V.G. Amelin. *J. Anal. Chem.*, **78**, 426 (2023). DOI: 10.1134/S1061934823030139].
- [18] S. Banik, S.K. Melanthota, J.M. Arbaaz, V.M. Kadambalithaya, I. Hussain, S. Dutta, N. Mazumder. *Anal. Bioanal. Chem.*, **413** (9), 2389 (2021). DOI: 10.1007/s00216-021-03184-z
- [19] S.K. Saha, N. Kazipet, P. Murray. *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 7532897 (2018). DOI: 10.1155/2018/7532897
- [20] R.O. Gumprecht, C.M. Slipcevic. *J. Chem. Phys.*, **57** (1), 90 (1953). DOI: 10.1021/j150502a019
- [21] W.H. Aughey, F.J. Baum. *J. Opt. Soc. Am.*, **44** (11), 833 (1954). DOI: 10.1364/JOSA.44.000833
- [22] P. Latimer. *Plant. Physiol.*, **34** (3), 193 (1959). DOI: 10.1104/pp.34.3.193
- [23] P. Latimer. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119** (1), 580 (1967). DOI: 10.1016/0003-9861(67)90493-6
- [24] P. Latimer. *Appl. Opt.*, **22**. (8), 1136 (1983). DOI: 10.1364/AO.22.001136
- [25] P. Latimer. *Photochem. Photobiol.*, **38** (6), 731 (1983). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb03608.x
- [26] Н.Г. Хлебцов, А.Г. Мельников. *Журн. прикл. спектр.*, **47** (5), 807 (1987). [N.G. Khlebtsov, A.G. Melnikov. *J. Appl. Spectrosc.*, **47**, 1174 (1987). DOI: 10.1007/BF00659819].
- [27] A. Shaish, M. Avron, A. Ben-Amotz. *Plant Cell Physiol.*, **31** (5), 689 (1990). DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077964
- [28] О.И. Соколов, Н.Ю. Селиванов, В.А. Богатырев, О.Г. Селиванова, Ю.И. Великородная, А.Я. Почепцов, Б.Н. Филатов, С.Ю. Щеголев, Л.А. Дыкман. *ДАН*, **468** (6), 713 (2016). DOI: 10.7868/S0869565216180286 [O.I. Sokolov,

- N.Y. Selivanov, V.A. Bogatyrev, O.G. Selivanova, Y.I. Velikorodnaya, A.Y. Pocheptsov, B.N. Filatov, S.Y. Shchyogolev, L.A. Dykman. Dokl. Biochem. Biophys., **468**, 232 (2016). DOI: 10.1134/S1607672916030212.]
- [29] N. Farhat, M. Rabhi, H. Falleh, J. Jouini, C. Abdelly, A. Smaoui. J. Phycol., **47** (5), 1072 (2011). DOI: 10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x
- [30] A.A. Golubev, A.Y. Prilepskii, L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov, V.A. Bogatyrev. Toxicol. Sci., **151** (1), 115 (2016). DOI: 10.1093/toxsci/kfw023.
- [31] Д.С. Чумаков, А.А. Голубев, Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов, В.А. Богатырев. Колл. журн., **79** (6), 808 (2017). DOI: 10.7868/S0023291217060143 [D.S. Chumakov, A.A. Golubev, L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov, V.A. Bogatyrev. Colloid J., **79**, 844 (2017). DOI: 10.1134/S1061933X17060059.]
- [32] M.N. Merzlyak, K.R. Naqvi. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, **58** (2–3), 123 (2000). DOI: 10.1016/S1011-1344(00)00114-7
- [33] К.А. Чеканов, А.Е. Соловченко. Физиология растений, **62** (2), 291 (2015). DOI: 10.7868/S0015330315010030 [K.A. Chekanov, A.E. Solovchenko Russ. J. Plant Physiol., **62** (2), 270 (2015). DOI: 10.1134/S1021443715010033.]
- [34] P. Latimer, E. Rabinowitch. J. Chem. Phys. **24**, 480 (1956). DOI: 10.1063/1.1742516
- [35] H.C. Van de Hulst. *Light Scattering by Small Particles* (Wiley, N.Y., 1957).
- [36] P. Latimer, E. Rabinowitch. Arch. Biochem. Biophys. **84**, 428 (1959). DOI: 10.1016/0003-9861(59)90605-8
- [37] J. Amesz, L.N.M. Duysens, D.C. Brandt. J. Theor. Biol., **1**, 59 (1961). DOI: 10.1016/0022-5193(61)90026-1
- [38] P. Latimer, C.A.H. Eubanks. Arch. Biochem. Biophys., **98**, 274 (1962). DOI: 10.1016/0003-9861(62)90184-4
- [39] V.V. Tuchin. J. Phys. D: Appl. Phys. **38** (15), 2497 (2005). DOI: 10.1088/0022-3727/38/15/001
- [40] L.E. Paramonov. Atmos. Ocean. Opt., **31** (3), 263 (2018). DOI: 10.1134/S1024856018030107