20

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

© В.А. Богатырев[1,2], Д.А. Пузанов[1], Л.А. Дыкман[1], Н.Г. Хлебцов[1,2]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ „Саратовский научный центр РАН“, Саратов, Россия
[2] 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 β-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, находит 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 β-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 взвеси. 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 $3-5\,\mu$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 (BA) [27] с 1.5 M NaCl при комнатной температуре ($21-24^\circ$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 $(5.4 \pm 1.0) \times 10^6\,\mathrm{mL}^{-1}$ по данным счетчика клеток TC-20 BioRad (США). Содержание биомассы при этом составляет 3.6 ± 0.2 mg/mL по определению гравиметрическим способом после седиментационного осаждения 1000 g, 5 min. Содержание основных пигментов составляет: хлорофилл a — $12.4 \pm 0.04\,\mu$g/mL, хлорофилл b — $4.68 \pm 0.009\,\mu$g/mL, каротиноиды — $7.29 \pm 0.02\,\mu$g/mL по определению в спиртовых экстрактах спектрофотометрическим способом.

2.2. Статистическая обработка

Все разведения и измерения проводили в дуплицированных 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 mm соответственно при заполнении лунок объемами 200, 500 и 2000 μL. 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 μL), Magenta (15 μL) и Blue (8.75 μL). В скобках указаны количества, дающие максимально регистрируемые в пиках значения (≈ 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 светофильтров 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 $V(\mathrm{R})$, $V(G)$, $V(\mathrm{B})$, или общей интенсивности $V(H)$, усредненные по площади выделения (области интереса, выделенной на изображении). Значения оптической плотности рассчитывали по формуле

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

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]

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

$$Chl_b(\mu\mathrm{g}/mL) = 20.13A_{649} - 5.03A_{665}, \qquad (3)$$

$$Car(\mu\mathrm{g}/mL) = \frac{1000A_{470} - 3.27A_{665} - 104A_{649}}{227}, \qquad (4)$$

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 СМ ВА. 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

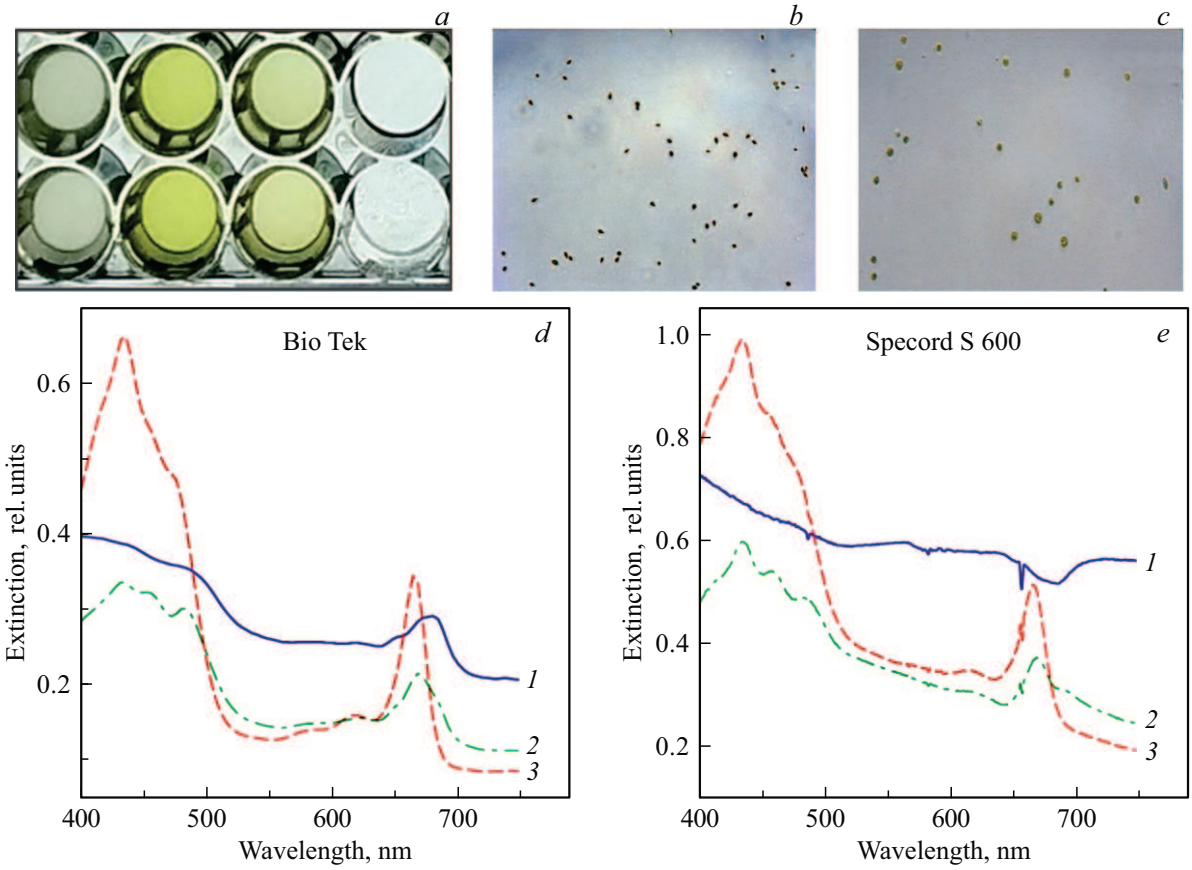

Рис. 1. (*a*) Фрагмент 48-луночного планшета с дуплицированными рядами лунок с суспензией живых микроводорослей в СМ, просветленный PEG 400 спиртовой экстракт этой взвеси (PEG 400 EtOH) и просветленная PEG 400 взвесь. Четвертая лунка пустая. Микрофотографии нативной (*b*) и просветленной (*c*) взвеси. 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 μL взвеси микроводоросли, по 500 μL 96% этилового спирта (EtOH) и 500 μL ПЭГ-400 с перемешиванием пипеткой. После 5 min инкубации в темноте проводили фотосъемку и измерения на BioTek Epoch 2.

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

3. Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведено изображение фрагмента планшета с дуплицированными 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 спектрофотометре, 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

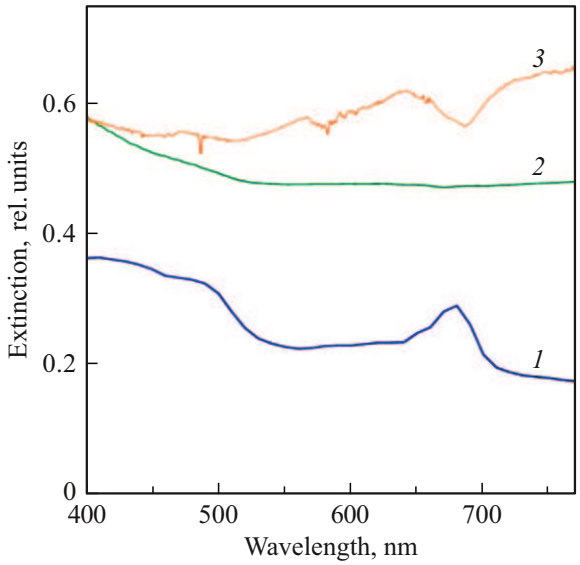

Рис. 2. Спектры экстинкции суспензии живых микроводорослей *D. salina* D 294, измеренные на спектрофотометрах BioTek (*1*), S 300 (*2*) и S 600 (*3*).

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 названными селективным рассеянием. С физической точки зрения поглощающие пигменты в клетках действуют как селективные фильтры с полосами поглощения каротиноидов (~ 470 nm) и хлорофиллов (~ 680 nm), в то время как рассеяние крупными клетками подчиняется известному степенному закону λ^{-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). Поэтому 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 раздельного 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 ($n^{20}D = 1.468$) 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 ρ 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-

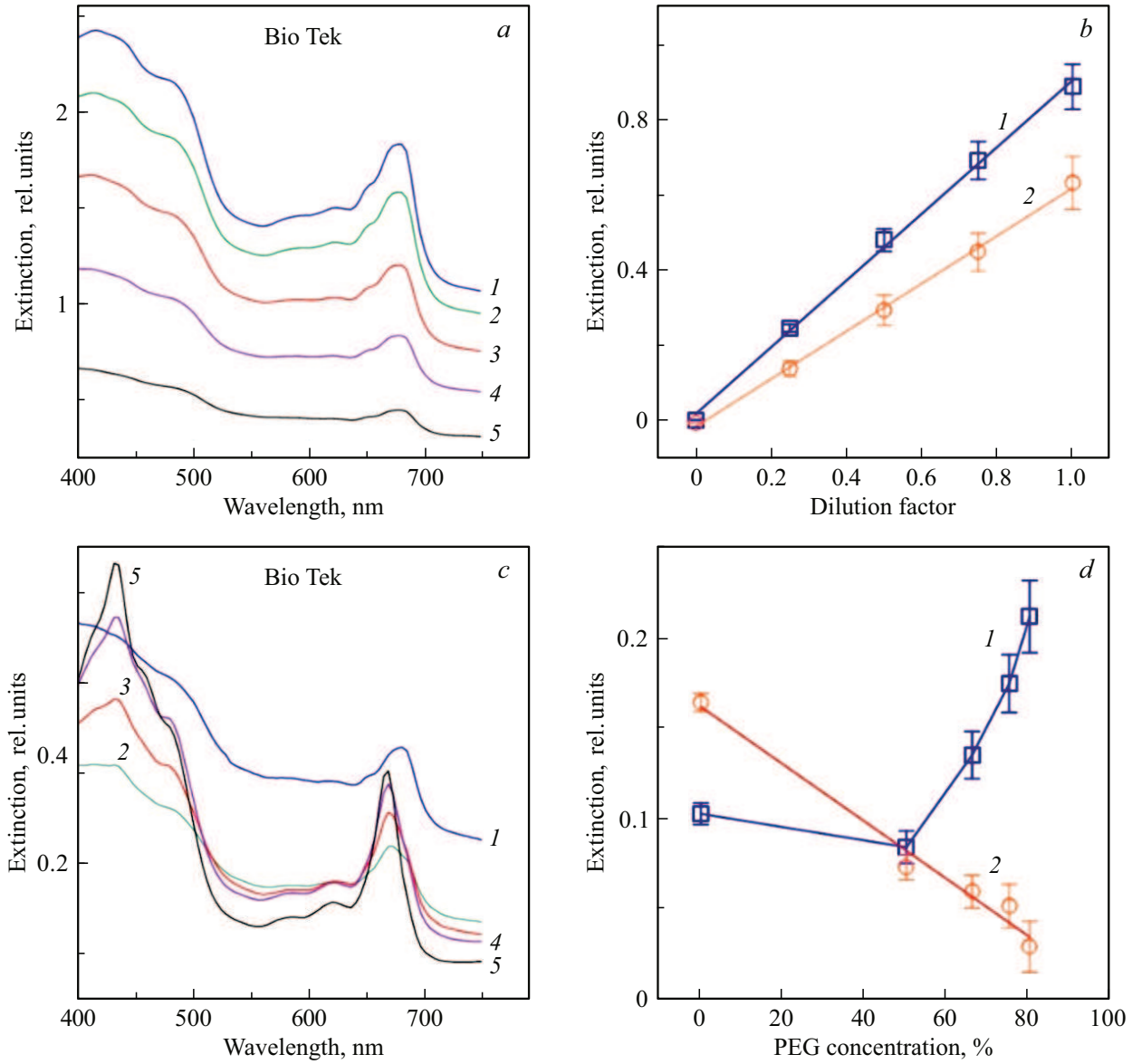

Рис. 3. Спектры экстинкции суспензии живых микроводорослей *D. salina* D 294, измеренные на микропланшетном спектрофотометре BioTek в серии разведений с шагом 25% CM (*a*) или PEG 400 (*c*), кривые *1–5*; *1* — исходный образец. Зависимости экстинкции E_{750} (1) и $E_{680-750}$ (*2*) от фактора разведения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

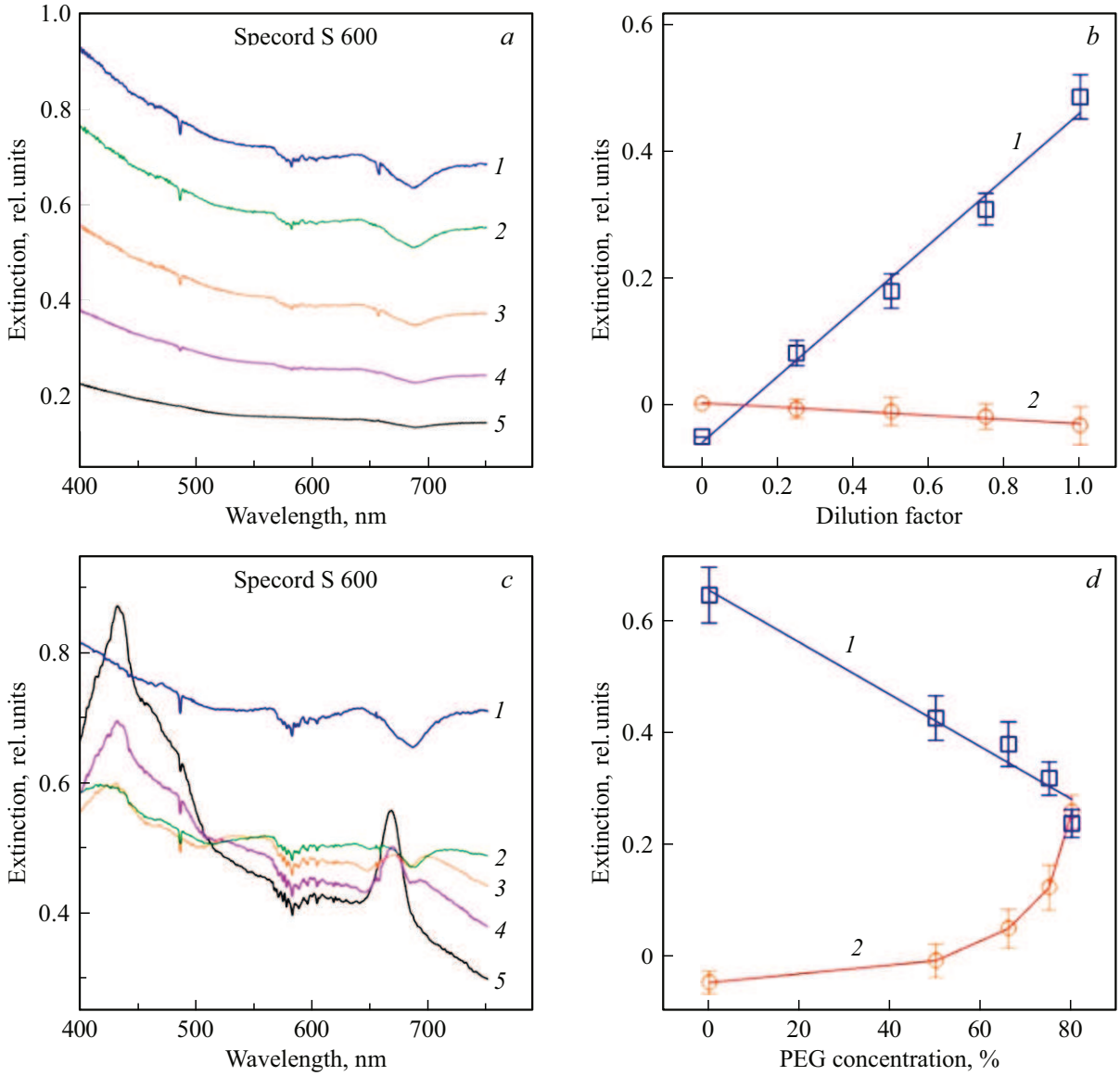

Рис. 4. Спектры экстинкции суспензии живых микроводорослей *D. salina* D 294, измеренные на микропланшетном спектрофотометре Specord S 600 в серии разведений с шагом 25% СМ (*a*) или PEG 400 (*c*), кривые *1–5*; *1* — исходный образец. Зависимости экстинкции (*1*) и (*2*) от фактора разведения $DF =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

пензий микроводорослей с возможно большого расстояния, что, кроме прочего, снижает искажающее влияние фотографического параллакса. На рис. 5, *a, b* показаны фрагменты 48-луночных планшетов с дуплицированными 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 $\ln(H/H_{blank})$ порядка 3 аналогично другим спектрофотометрам, демонстрируя хорошее соблюдение закона Бугера (рис. 5, *c*). Изменения сигнала, регистрируемые камерой смартфона в просветленных взвесях, аналогичны измерениям на спектрофотометре Specord S 600.

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

Можно заметить, что для культуры D 294 хорошая линейность выполняется до оптических плотностей ~ 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

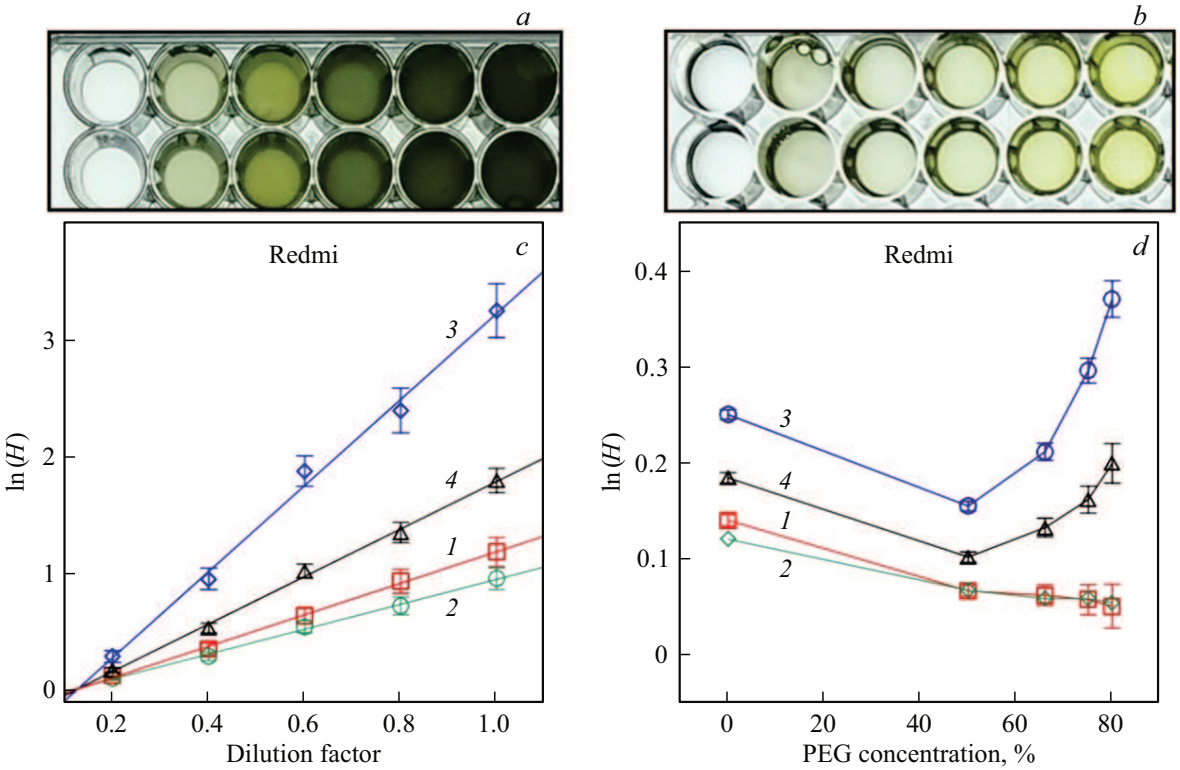

Рис. 5. Фотографии фрагмента планшета с рядами разведений суспензии микроводорослей *D. salina* D 294 CM (*a*) и иммерсионной средой ПЭГ 400 (*b*). Панели (*c*) и (*d*) показывают зависимости коэффициентов ослабления (за вычетом бланка) для цветовых каналов R, G, B (кривые *1–3*) и общего сигнала гистограммы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

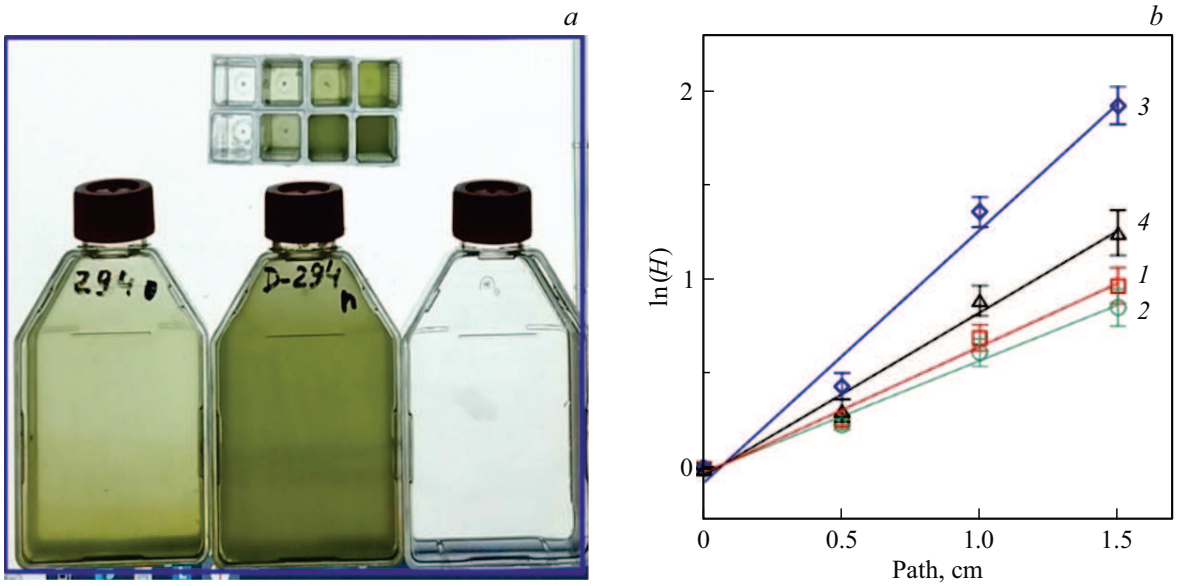

Рис. 6. (*a*) Фотографии флаконов с культурой *D. salina* D 294 и CM и кювет, заполненных на 0.5, 1 и 1.5 cm. (*b*) Зависимости коэффициентов ослабления (за вычетом бланка) для цветовых каналов R, G, B (кривые *1–3*) и общего сигнала гистограммы *H* (кривая *4*) культур микроводоросли от толщины оптического слоя. Прямые — линейные аппроксимации.

значений оптической плотности за пределы линейного участка динамического диапазона для регистрации ослабления света методом ЦФ можно использовать способ „слоя переменной толщины“ (рис. 7), экстраполируя измерения в тонком слое на весь объем суспензии.

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

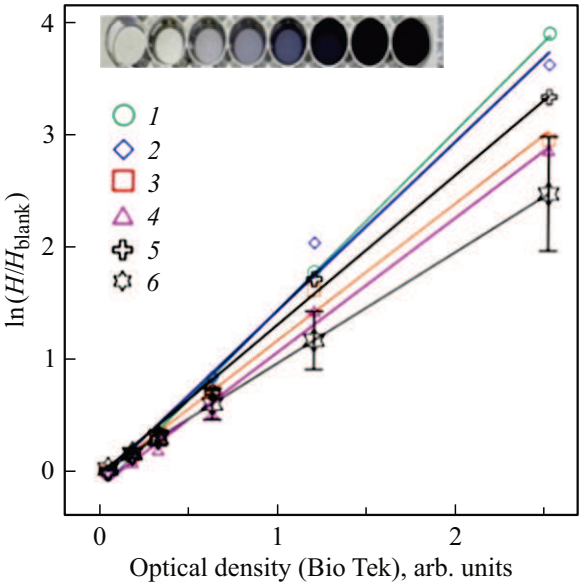

Рис. 8. Линейная корреляция оптических плотностей, полученных на планшетном спектрофотометре BioTek и методом ЦФ на различных смартфонах: *1* — iPhone 16 Pro, *2* — Redmi 9T, *3* — Samsung SM M32, *4* — Redmi 14 C. *5* — усредненная линейная аппроксимация для всех четырех смартфонов, *6* — нормированная 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.

Одной из целей настоящего исследования было выяснение возможности простой оценки биомассы микроводорослей по характеристикам мутности суспензии, 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 четырёх 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 $(H) = 1.35\times\mathrm{OD}_{\mathrm{BioTek}}$ 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 ~ 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 взвесях 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. Осколок, 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. Karinca, 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. Осколок, 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. Осколок, 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. Sliepcevich. J. Phys. Chem., **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. Melńikov. 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