ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет

КОМПЛЕКСНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РЫБОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ОТРАСЛИ

Материалы II Национальной
научно-технической конференции
студентов, аспирантов и молодых ученых

(Владивосток, 27–28 ноября 2025 года)

Электронное издание

Владивосток
Дальрыбвтуз
2026

УДК 639.2
ББК 65.35
К63

Организационный комитет конференции:

Председатель – Денисова Елена Викторовна, начальник научного управления ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз».

Зам. председателя – Вайнутис Константин Сергеевич, канд. биол. наук, доцент, председатель Совета молодых ученых ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз».

Секретарь – Афанасьев Константин Александрович, студент группы ВБб-412

Адрес оргкомитета конференции:
690087, г. Владивосток
ул. Луговая, 52б
Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет
Тел./факс: 8 (423) 2-44-11-76
http:// www.conf.dalrybvtuz.ru
e-mail: dalrybvtuz-conf@mail.ru

К63 **Комплексные исследования в рыбохозяйственной отрасли** : материалы II Нац. науч.-техн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. (49,9 Mb). – Владивосток : Дальрыбвтуз, 2026. – 566 с. – Систем. требования : PC не ниже класса Pentium I ; 128 Mb RAM ; Windows 98/XP/7/8/10 ; Adobe Reader V8.0 и выше. – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-88871-802-5

Представлены материалы, посвященные рациональному использованию водных биологических ресурсов, рыболовству, экологическим проблемам, аквакультуре, технике, технологии и управлению качеством продуктов из гидробионтов, эксплуатации водного транспорта и безопасности мореплавания, гуманитарным и социально-экономическим аспектам развития рыбной отрасли.

Приводятся результаты научных исследований студентов, аспирантов и молодых ученых.

УДК 639.2
ББК 65.35

ISBN 978-5-88871-802-5

© Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, 2026

УДК 582.26/.27:535.243.2

Анастасия Олеговна Антонова

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, гр. ВБм-112, Россия, Владивосток, e-mail: naastena.antonova.18@gmail.com

Научный руководитель – Анастасия Андреевна Политаева, ассистент

Разработка моделей для количественной оценки плотности культур микроводорослей спектрофотометрическим методом

Аннотация. Исследование направлено на разработку и валидацию точных калибровочных моделей для быстрой спектрофотометрической оценки плотности клеток в культурах микроводорослей, имеющих значение для аквакультуры (*D. salina*, *Ph. tricornutum*, *N. oceanica*). Методом линейной регрессии установлены видоспецифичные зависимости между ΔOD и концентрацией клеток. Полученные уравнения регрессии позволяют заменить трудоемкий прямой подсчет на быстрый и воспроизводимый спектрофотометрический анализ, что повышает эффективность мониторинга культивирования.

Ключевые слова: микроводоросли, количественная оценка, спектрофотометрия, оптическая плотность, калибровочная модель*, Dunaliella salina, Phaeodactylum tricornutum, Nannochloropsis oceanica,* аквакультура

Anastasia O. Antonova

Far Eastern State Technical Fisheries University, VBm-112, Russia, Vladivostok, e-mail: naastena.antonova.18@gmail.com

Scientific adviser – Anastasia A. Politaeva, Assistant

Development of models for spectrophotometric quantitative assessment of microalgae culture density

Abstract. The study aimed at developing and validating precise calibration models for rapid spectrophotometric assessment of cell density in microalgae cultures relevant for aquaculture (*D. salina*, *Ph. tricornutum*, *N. oceanica*). Using linear regression, species-specific dependencies between ΔOD and cell concentration were established. The obtained regression equations allow for replacing the labor-intensive direct cell count with a fast and reproducible spectrophotometric analysis, thereby enhancing the efficiency of cultivation monitoring.

Keywords: microalgae, quantitative assessment, spectrophotometry, optical density, calibration model, *Dunaliella salina, Phaeodactylum tricornutum, Nannochloropsis oceanica,* aquaculture

Введение

Современная аквакультура, сталкиваясь с необходимостью интенсификации и экологизации процессов, все чаще обращается к использованию микроводорослей как незаменимого компонента производственных цепочек [1]. Эти фотосинтезирующие организмы служат основой трофических пирамид, живым кормом на ранних стадиях развития гидробионтов, а также эффективными биоагентами для поддержания качества водной среды. В связи с этим оперативный и точный контроль за динамикой численности и физиологическим состоянием альгокультур становится важнейшей технологической задачей, непосредственно влияющей на продуктивность и стабильность всей системы [2].

Традиционно используемый метод прямого подсчета клеток в счетной камере является исключительно трудоемким и требует значительных временных затрат, что делает невоз-

можным частый мониторинг быстрорастущих культур. Кроме того, субъективность визуальной идентификации и высокая вероятность статистической погрешности при низких концентрациях снижают воспроизводимость результатов. Альтернативные гравиметрические методы, основанные на измерении сухого вещества, являются интегральными и ретроспективными, не позволяя отслеживать процесс в реальном времени [3].

Спектрофотометрический метод основан на корреляции между оптической плотностью суспензии и концентрацией биомассы [4]. Однако его широкое применение сдерживается рядом методических сложностей. Ключевой из них является нелинейность и видоспецифичность калибровочных зависимостей, обусловленная значительными различиями в размере клеток, морфологии и в качественном и количественном составе пигментных комплексов у разных таксонов водорослей [5].

Цель работы – разработать видоспецифичные калибровочные модели для быстрой и точной оценки плотности клеток микроводорослей *D. salina*, *Ph. tricornutum* и *N. oceanica* спектрофотометрическим методом.

Материал и методика

Исследования проводились в условиях лаборатории культивирования микроводорослей Научно-производственного департамента марикультуры и кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз».

В основу работы положены чистые культуры *D. salina*, *Ph. tricornutum* и *N. oceanica*, по 10 проб каждой, охватывающих различные фазы роста. Культуры были выращены на питательной среде Гольдберга [6] в накопительном режиме. Температура в лаборатории поддерживалась на уровне 28–30 °С при непрерывной освещенности не менее 10 клк. Режим светового дня составлял 12 ч. Для предотвращения седиментации и обеспечения равномерного освещения механическое перемешивание культур проводилось каждые 2 ч в течение светлой фазы. Ежедневный мониторинг на альгологическую чистоту проводился методом световой микроскопии. Плотности клеток определялись путем прямого подсчета в камере Нойбауэра под световым микроскопом «Ломо Микмед-6» при увеличении ×400. Подсчет клеток проводили не менее чем в 5 больших квадратах для получения статистически значимого результата [7].

Спектрофотометрические измерения проводились на двухлучевом спектрофотометре Persee T7DS с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. В соответствии с протоколом исследования первоначально выполнялась калибровка нуля по стерильной питательной среде Гольдберга для установки 100 % пропускания. Каждая проба измерялась трехкратно с последующим усреднением результатов и расчетом стандартного отклонения, что отражено в представленных данных в виде значений оптической плотности с указанием погрешности (табл. 1).

Таблица 1 – Материал, положенный в основу работы

Дата	№ пробы	Вид	Количество клеток, экз./мл	Оптическая плотность OD	
				480 нм	680 нм
1	2	3	4	5	6
05.06.2025 – 15.06.2025	1	*D. salina*	4 486 660	0,677±0,001	0,639±0,003
	2		4 945 000	0,531±0,003	0,500±0,001
	3		3 285 000	0,332±0,002	0,315±0,003
	4		3 652 000	0,393±0,006	0,372±0,005
	5		3 765 000	0,347±0,001	0,331±0,002
	6		1 950 000	0,261±0,006	0,249±0,007
	7		2 965 000	0,354±0,001	0,343±0,002
	8		2 955 000	0,376±0,001	0,359±0,001
	9		4 690 000	0,587±0,002	0,573±0,004
	10		3 420 000	0,298±0,001	0,287±0,002

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6
	№ пробы	Вид	Количество клеток, экз./мл	Оптическая плотность OD	
				450 нм	680 нм
	1	*N. oceanica*	108 600 000	2,267±0,001	2,325±0,004
	2		45 300 000	1,487±0,002	1,382±0,002
	3		24 850 000	0,711±0,001	0,621±0,001
	4		31 350 000	0,853±0,001	0,752±0,003
	5		30 900 000	0,957±0,001	0,866±0,001
	6		23 500 000	0,620±0,001	0,541±0,001
	7		39 500 000	1,368±0,004	1,255±0,001
	8		28 950 000	0,904±0,003	0,802±0,003
	9		17 900 000	0,661±0,003	0,581±0,003
	10		15 250 000	0,513±0,001	0,454±0,001
	№ пробы	Вид	Количество клеток, экз./мл	Оптическая плотность, OD	
				450 нм	680 нм
	1	*Ph. tricornutum*	6 750 000	0,851±0,003	0,782±0,004
	2		2 410 000	0,339±0,003	0,297±0,001
	3		3 050 000	0,438±0,005	0,426±0,002
	4		3 720 000	0,412±0,003	0,452±0,003
	5		5 660 000	0,975±0,010	0,930±0,005
	6		3 195 000	0,524±0,002	0,468±0,003
	7		5 160 000	2,059±0,006	1,742±0,003
	8		2 110 000	0,333±0,003	0,302±0,003
	9		3 220 000	0,514±0,002	0,500±0,002
	10		940 000	0,172±0,002	0,156±0,000

Снятие спектральных характеристик проводилось на двух длинах волн: 680 нм, соответствующей максимуму поглощения хлорофилла *a*, и видоспецифичной волне – 480 нм для *D. salina* или 450 нм для *Ph. tricornutum* и *N. oceanica*, что соответствует пикам поглощения их основных каротиноидов, таких как β-каротин и фукоксантин [8, 9]. Для минимизации погрешности, вызываемой неспецифическим светорассеянием, рассчитывали скорректированные значения оптической плотности (ΔOD) путем вычитания показания на 680 нм из показания на видоспецифичной длине волны.

Для каждого вида микроводорослей было построено три потенциальные калибровочные модели: зависимость концентрации от оптической плотности на видоспецифичной длине волны (ODλ), зависимость от оптической плотности на 680 нм (OD680) и зависимость от скорректированного параметра ΔOD. Построение моделей осуществлялось методом линейного регрессионного анализа наименьших квадратов в среде MS Excel с расширениями Analyse-it и Power Analytics, где в качестве независимой переменной (X) выступала концентрация клеток, определенная прямым подсчетом (кл./мл), а в качестве зависимой (Y) – соответствующий оптический параметр. Выбор оптимальной модели проводился на основе комплекса статистических критериев. Основным показателем являлся коэффициент детерминации R^2, близость которого к единице свидетельствует о том, что модель объясняет практически всю дисперсию экспериментальных данных. Проверка нормальности распределения ошибок проводилась с помощью теста Шапиро-Уилка, ($p > 0,05$) [10, 11].

Результаты и их обсуждение

Для всех трех исследуемых видов микроводорослей получены линейные калибровочные модели с коэффициентами детерминации. Результаты расчета основных статистических параметров для количественной оценки плотности культур представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Результаты расчета основных статистических параметров для количественной оценки плотности культур спектрофотометрическим методом

Параметр \ Вид культуры	*Dunaliella salina* ($\Delta OD_{480-680}$)	*Nannochloropsis oceanica* ($\Delta OD_{450-680}$)	Phaeodactylum tricornutum (ΔOD450-680)
Калибровочное уравнение (Y = k*X + b)	$Y = 1{,}51\times10^{7} * X + 1{,}62\times10^{5}$	$Y = 8{,}69\times10^{7} * X + 1{,}12\times10^{6}$	$Y = 1{,}33\times10^{7} * X + 1{,}08\times10^{5}$
Среднее значение ΔOD ($\bar{X}$)	0,023	-0,076	0,056
Стандартное отклонение ΔOD (s)	0,016	0,057	0,093
Диапазон рабочих концентраций, кл./мл	$2{,}0\times10^{6} – 5{,}0\times10^{6}$	$1{,}5\times10^{7} – 1{,}1\times10^{8}$	$0{,}9\times10^{6} – 6{,}8\times10^{6}$
Парный t-тест ($OD\lambda$ vs OD_{680}), p-value	< 0,001 (10^{-60})	< 0,001 (10^{-68})	< 0,001 (10^{-58})
Тест Шапиро-Уилка	0,136	0,049	0,004

Для *Dunaliella salina* была выведена модель вида при $R^2 = 0{,}997$ для диапазона концентраций от 2 до 5 млн кл./мл:

$$\text{Кл./мл} = 1{,}51 \times 10^{7} \times (OD_{480} - OD_{680}) + 162{,}21,$$

где Кл./мл – количество клеток *D. salina* в мл;1,51 и 162,21 – коэффициенты; OD_{480} и OD_{680} – оптическая плотность, нм.

Для *Nannochloropsis oceanica* выделена модель с $R_2 = 0{,}985$, которая может быть использована вдиапазоне плотностей от 15 до 110 млн кл./мл:

$$\text{Кл./мл} = 8{,}69 \times 10^{7} \times (OD_{450} - OD_{680}) + 1{,}12 \times 10^{6},$$

где Кл./мл – количество клеток *N. oceanica* в мл; 8,69 и 1,12 – коэффициенты; OD_{450} и OD_{680} – оптическая плотность, нм.

Несмотря на небольшое отклонение от линейности в области максимальных плотностей, что может быть связано с эффектом затухания луча или изменением физиологических характеристик клеток в стационарной фазе, модель можно использовать для рутинного мониторинга.

Для *Phaeodactylum tricornutum* также была подтверждена эффективность двухволнового подхода. Оптимальной для этого вида стала модель с коэффициентом детерминации $R_2 = 0{,}956$:

$$\text{Кл./мл} = 1{,}33 \times 10^{7} \times (OD_{450} - OD_{680}) + 107{,}773,$$

где Кл./мл – количество клеток *Ph. tricornutum* в мл; 1,33 и 107,773 – коэффициенты; OD_{450} и OD_{680} – оптическая плотность, нм.

Сравнительный анализ моделей для исследуемых видов микроводорослей наглядно показал, что методика с применением ΔOD является универсальным и оптимизированным подходом. Во всех случаях коэффициент детерминации R^2 для моделей с ΔOD оказался значимо выше, чем для моделей, построенных на основе OD450/OD480 или OD680. Проведенная коррекция снижает влияние мешающих факторов, таких как светорассеяние и неспецифическое поглощение, выделяя сигнал, пропорциональный биомассе живых клеток с их специфическим пигментным составом.

Модели валидны в установленных диапазонах концентраций и обеспечивают быстрый, воспроизводимый и точный альтернативный метод контроля роста культур, существенно экономящий время по сравнению с прямым микроскопическим подсчетом.

Библиографический список

1. Макарова Е. И., Отурина И. П., Сидякин А. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей-обитателей водных экосистем // Экосистемы. 2009. № 1(20). С. 120–133.

2. Schagerl M., Siedler R., Konopáčová E., Ali S. Estimating Biomass and Vitality of Microalgae for Monitoring Cultures: A Roadmap for Reliable Measurements // Cells. 2022. № 11. P. 2455. DOI:10.3390/cells11152455.

3. Дивин А. Г., Пономарев С. В., Мозгова Г. В. Методы и средства измерений, испытаний и контроля: учеб. пособие. 2011. Ч. 1. Т. 1.

4. Solovchenko A. Seeing good and bad: Optical sensing of microalgal culture condition. // Algal Research. 2023. № 71. P. 103071. DOI:10.1016/j.algal.2023.103071.

5. Тютяев Е. В. Исследование физико-химических свойств каротиноидов при действии температуры и изменения генетического профиля клетки: дис. Саранск; М., 2016.

6. Стравинскене Е. С. Григорьев Ю. С., Шашкова Т. Л., Субботин М. А., Полосухина М. А. Влияние состава питательной среды на чувствительность водоросли Dunaliella tertiolecta к бихромату калия // Теоретическая и прикладная экология. 2021. №. 3. С. 186–192.

7. Dökümcüoğlu V. E., Yılmaz M. Assessment of cell counting method based on image processing for a microalga culture // Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research. 2020. Т. 3, №. 2. С. 75–81.

8. Myers J. A., Curtis B. S., Curtis W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density // BMC Biophys. 2013. Vol. 6, № 4. DOI: 10.1186/2046-1682-6-4.

9. Stoddart M. J. Cell viability assays: Introduction // Methods Mol Biol. 2011. Vol. 740. P. 1–6.

10. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986.

11. Sonawane S. S., Chhajed S. S., Attar S. S. et al. An approach to select linear regression model in bioanalytical method validation // J Anal Sci Technol. 2019. Vol. 10, № 1. DOI: 10.1186/s40543-018-0160-2.