

СУРЕШКУМАР П.¹, ТОМАС Дж.¹, СУБРАМАНЯН Дж.²

¹Лаборатория исследования водорослевой биомассы,
Отделение биологических наук и технологий,
Карунский университет, Каруня Нагар, Коимбаторе 641114, Индия

²Отделение физики, Колледж Мадуры,
Мадурай 625011 Тамил Наду, Индия
jibuthomas.t@gmail.com

БЫСТРЫЙ МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИСКРИМИНАЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НА ОСНОВЕ ВИБРАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Изучали вариации спектральных данных четырех представителей микроводорослей. Обнаружены существенные различия в составе их основных макромолекул. *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kütz. имеет сильные пики в областях липидов и белковых спектров, у *Chlorella vulgaris* Beij., *Ch. pyrenedosa* Chick и *Euglena gracilis* Klebs наблюдались умеренные и менее интенсивные пики во всех пяти спектральных областях. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-ПФ) представляет собой спектроскопический метод высокого разрешения, способный выявить особенности макромолекулярного спектра в интактных клетках, что позволяет различать, классифицировать и идентифицировать микроорганизмы, поскольку состав их макромолекул специфичен. Иерархический кластерный анализ с использованием ИК-ПФ-спектров позволяет получить дендрограмму, отражающую четкие различия между исследуемыми штаммами в соответствии с вариациями их фенотипа. Проведен филогенетический анализ с использованием 16S рДНК этих микроагрегатных штаммов. Полученная филограмма показала ту же структуру кластеров, что и дендрограммы на основе ИК-ПФ. Сочетание филогенетического анализа и ИК-ПФ-спектров обеспечивает эффективный способ распознавания вида, а также преимущество одновременного определения биохимического состава видов.

Ключевые слова: ИК-ПФ, микроводоросли, кластерный анализ, филогенетический анализ, дискриминация видов, фингерпринтинг, биохимический состав

Введение

Микроводоросли являются перспективным биотехнологическим ресурсом, обеспечивающим значительную экономическую прибыль и не наносящим ущерб окружающей среде (Driver et al., 2014). В настоящее время содержание основных биомолекулярных соединений (липиды, белки и углеводы) в клетках микроводорослей, как правило, изучают, используя традиционные стандартные методы, такие как химическая

© Сурешкумар П., Томас Дж., Субраманиян Дж., 2017

экстракция с последующим гравиметрическим определением, спектрофотометрия или масс-спектроскопия. Однако эти методы требуют затрат, занимают много времени и в них используются опасные реагенты. Поскольку это многоступенчатые процедуры, они неизбежно сопровождаются ошибками, что приводит к несоответствиям в полученных результатах. Особенно часто такое случается, если макромолекулы различных соединений изучают изолированно. Это не позволяет выявлять качественные и количественные изменения в биохимическом составе клеток при длительном культивировании штаммов микроводорослей в питательной среде и давать им оценку. В данном случае целесообразно использовать метод инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-ПФ).

При анализе интактных клеток микроводорослей метод ИК-ПФ более эффективен с точки зрения затрат средств и времени. Он позволяет получать подробные молекулярные спектры с углубленной биохимической информацией. Анализ элементарного состава, формы пиков и интенсивности поглощения при конкретных волновых числах позволяет получить информацию о функциональных группах и структуре молекул. Эти данные могут быть использованы для дискриминации штаммов на основе различий в их биохимическом составе.

Для идентификации и классификации микроводорослей используют различные показатели: особенности морфологического строения, биохимические маркеры (состав липидов, каротиноидов и фикобилипротеинов), молекулярные методы (электрофорез белков и анализ последовательности ДНК и 18S рРНК). Хотя для идентификации видов можно использовать метод молекулярного штрихкодирования, сведения о нуклеотидных последовательностях таксонов в онлайн-базах данных неполные, что затрудняет поиск совпадений. Использование методов молекулярно-генетического анализа также имеет определенные технические ограничения, среди которых сложность стандартизации молекулярно-биологических протоколов, специфический дизайн и синтез праймеров ПЦР, точечные мутации и стоимость реагентов молекулярного класса. А.Р. Dean et al. (2010) успешно использовали ИК-ПФ-спектроскопию в сочетании со статистическими методами распознавания и идентификации микроводорослей. ИК-ПФ-спектроскопия требует минимальной подготовки проб без использования каких-либо реагентов, характеризуется быстротой, минимальными материальными затратами и предоставляет данные как о качественных, так и количественных параметрах биологических соединений.

Цель нашего исследования – с использованием ИК-ПФ-спектров определить основные биомолекулы четырех видов эвкариотических микроводорослей, а также получить данные о видоспецифических метаболических показателях для дискриминации видов с фенотипическими вариациями на генотипическом уровне.

Материалы и методы

Культуры микроводорослей и условия их содержания. В работе использовали штаммы микроводорослей *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Ch. pyrenedoisa* и *Euglena gracilis* из Национальной коллекции промышленных микроорганизмов (National Collection of Industrial Microorganisms, NCIM) в Пуне (Индия). Для их выращивания использовали ряд питательных сред: обычную и модифицированные среды Фогга (Fogg's), Bold basal и *Euglena media*. Культуры в литровых колбах выращивали 15 сут в стерильных условиях, с чередованием световой и темновой фаз 16 : 8, интенсивностью освещения ~1500 лк при температуре 28 ± 2 °C.

Биомассу микроводорослей из культур извлекали при помощи вакуумной фильтрации (вакуумный стеклянный блок Ватмана) и высушивали с получением гомогенного порошка для ИК-ПФ-анализа.

Спектральная обработка и анализ данных ИК-ПФ. Спектры ИК-ПФ были получены с помощью ИК-ПФ спектрометра Nicolet-Avatar-360, оснащенного ДТГС (дейтерированный триглицинсульфат) с воздушным охлаждением и продувкой азотом. Спектры регистрировали в диапазоне $4000-400$ см^{-1} при разрешении 4 см^{-1} . Пробы образцов в 3-кратной повторности спектрально анализировали в гомогенных условиях. Полученные для каждой повторности данные были нормализованы и оценены; всего получено и нормализовано 50 сканирований. Спектры анализировали с использованием программного обеспечения ORIGIN 6.0 (OriginLab Corporation, Массачусетс, США). Исходные поправки были применены ко всем спектрам как порог отрицания, чтобы свести к минимуму различия между записанными спектрами из-за неизбежного превышения базовых сдвигов с использованием алгоритма базовой коррекции. Положение полос измеряли в соответствии с центром тяжести. В процессе анализа данных поведение спектров было нормализовано по отношению к конкретным полосам с использованием вышеупомянутого программного обеспечения. После процесса нормализации области затенения полосы были численно измерены (Sivakumar et al., 2013).

Кластерный анализ. Для отображения сходства спектров на основе иерархического кластерного анализа (НСА) были построены дендрограммы с применением метода минимальной вариации (Ward, 1963) и программного обеспечения Minitab 17.0 (Minitab Inc., State College, Пенсильвания, США). Если величина спектрального расстояния между образцами уменьшается, то, исходя из их спектральных характеристик, это означает, что между ними больше сходства.

Результаты и обсуждение

Окна. Назначение полос в спектре микроводорослей. Две области в диапазоне среднего инфракрасного диапазона ($4000-400$ см^{-1}) между $3000-2800$ и $1800-900$ см^{-1} (Movasaghi et al., 2008), состоящие из

многочисленных перекрывающихся пиков, содержат большую часть биохимической информации. Числа, изображенные на конкретных полосах в ИК-ПФ-спектрах, соответствуют конкретным макромолекулам и метаболитам микроводорослей. Репрезентативные ИК-спектры видов микроводорослей приведены в табл. 1.

Таблица 1

Назначение полос для микроводорослей (Giordano et al., 2001; Murdock, Wetzel, 2009; Mayers et al., 2013)

Волновое число, см ⁻¹	Общее назначение полосы	Функциональная группа
3387	N—H растяжение / O—H растяжение	Белок, Амид А, вода
2960	CH ₃ асимметричное растяжение	Липиды
2922	CH ₂ асимметричное растяжение	Липиды
2854	CH ₂ асимметричное растяжение	Липиды
1744	C—O растяжение	Триглицериды, сложные эфиры холестерина
1651	C—O растяжение	Амид I (белок)
1548	N—H сгибание, C—N растяжение	Амид II (белок)
1458	CH ₂ сгибание	Липиды
1056	C—O растяжение	Полисахариды

В данном исследовании волновые числа были сгруппированы в пять спектральных окон, которые рассматривались с точки зрения конкретной информации и дискриминации на основе макромолекул (Naumann et al., 1991). Спектральная область между 3800–3100 см⁻¹ (область белков Амид А) представляет собой окно 1 (W1), что соответствует N-Н-валентному колебанию группы белковых остатков Амид А и O-Н-валентному колебанию окружающих молекул воды.

Спектральная область между 3000 и 2800 см⁻¹ (область жирных кислот) обозначена как окно 2 (W2), где преобладают алифатические -CH₃, >CH и CH=-валентные колебания функциональных углеводородных групп насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, обычно присутствующих в различных мембранах клеток и органелл амфипатической природы.

Спектральная область между 1800 и 1500 см⁻¹ (область амидов) относится к окну 3 (W3) и состоит из белков и пептидных доменов Амид I и Амид II. окно 4 (W4), спектральная область между 1500 и 1200 см⁻¹ представляет собой смешанный спектр, содержащий информацию о белках, жирных кислотах и фосфатсодержащих соединениях, а последняя часть спектра между 1200 и 900 см⁻¹ – это окно 5 (W5),

представляющее область полисахаридов – сложных углеводов, содержащихся в клеточной стенке. Их полосы поглощения уникальны как отпечатки пальцев. Это имеет важное значение для идентификации микроводорослей.

Интерпретация данных отображаемых спектров показала, что назначение окон помогает выделить химические различия, возникающие между видами. Детальный спектральный анализ был выполнен в трех областях: 3800–2600, 1800–1400 и 1300–700 cm^{-1} , включая все спектральные окна, указанные выше, что позволило найти сходство в спектральных характеристиках (рис. 1). Область спектра в диапазоне 2600–1800 cm^{-1} была исключена из спектрального анализа, так как эта часть содержит мало биологической информации, а поглощение маскируется атмосферным CO_2 (Giordano et al., 2009).

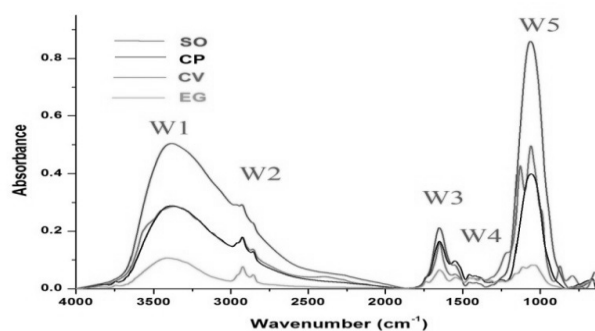


Рис. 1. Общие спектры (4000–400 cm^{-1}) для микроводорослей с соответствующими спектральными окнами

ИК-ПФ фингерпринтинг для видоспецифичной стратегии. ИК-ПФ-спектры, полученные для исследованных микроводорослей, свидетельствуют о том, что каждый из них имеет специфический спектральный фингерпринт, который отражает присущие им фенотипические различия, по которым их относят к разным видам. Так, наблюдались четкие отличия в форме и площади пиков спектров микроводорослей, что отражает изменения молярных концентраций биомолекул и их пространственного объема. Наиболее значительны различия в спектральных окнах W1, W2, W3 и W5, содержащих спектры поглощения белков, липидов и полисахаридов. Получены хорошо различимые и близкие между собой спектры с незначительными различиями в интенсивности полос. ИК-ПФ-спектры биомолекул *S. obliquus* и *E. gracilis* показали четкие отличия этих микроводорослей от *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenedoisa*.

Спектральная область W1 представляет колебания белков домена Амид А и асимметричное растяжение липидов CH_2 . Наиболее существенные различия наблюдаются в области Амид А: спектр *S. obliquus* четко отличается от спектров остальных трех видов микроводорослей,

тогда как *E. gracilis* проявляется только на базовом уровне этой области спектра. Абсорбция в этой области соответствует режимам растяжения N-H и O-H в воде, белках и полисахаридах (Сакмак et al., 2006). Поскольку вода полностью удаляется во время подготовки образца, ее вкладом в эту полосу можно пренебречь, и мы полагаем, что поглощение может быть обусловлено только белками. Другая крупная спектральная вариация наблюдалась в окне 3, которое соответствует белкам. Здесь преобладали вибрации структурных белковых групп Амид I и Амид II (Mayers et al., 2013). Значительную полосу при 1651 см^{-1} мы отнесли к Амид I из-за режима растяжения C-O белка, а при 1548 см^{-1} – к Амид II за счет поглощения изгибной вибрации N-H-полосы. *Scenedesmus obliquus* показал более сильную абсорбцию в области Амид I, чем другие микроводоросли, тогда как в области Амид II ни один из видов микроводорослей не давал заметного пика. Область охвата и морфология полосы были удивительно сходными с белками Амид A. В нашем исследовании спектры белковой области имели более выраженные пики, чем таковые у других макромолекул.

Липиды имеют характерные полосы поглощения в областях W2 и W3. Это спектральная область около 1744 см^{-1} (W3), представляющая собой вибрацию растяжения сложного эфира C=O, и область $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ (W2), представляющая вибрацию растяжения C-H в ацильных цепях (Giordano et al., 2001). Полоса при 1744 см^{-1} соответствует эфирам жирных кислот, имеющим важное значение для идентификации микроводорослей – потенциальных источников биотоплива. В нашем исследовании штамм *E. gracilis* показал интенсивную полосу в этой области. Установлено, что стерическое асимметричное растяжение метиленовой группы липидной части имеет более высокое поглощение липидного содержания, чем колебательное растяжение сложноэфирных связей. Как видно из рис. 1, *E. gracilis* демонстрировала более заметный пик в этой области с высокой интенсивностью, чем другие виды. Спектральная вариация асимметричного растяжения метиленовой группы аналогична вариации спектров всех изученных видов, наблюдаемой в области Амид A, но с более низкими полосами поглощения, что непосредственно отражает концентрацию биомолекул. Микроводоросли, культивируемые на средах с различным составом питательных веществ или подвергнутые азотному или фосфорному голоданию, показали значительное отклонение в спектрах, причем в пределах одного и того же вида. Изменение спектров в части, отражающей область хранения биомолекул, вызывалось физиологическими реакциями на изменение условий поглощения питательных веществ (de Moraes and Vieira, 2014).

Среднеинфракрасные спектры глюкозы и гидролизата крахмала показывали поглощения, состоящие из сложных перекрывающихся и сходящихся полос между 1200 и 1000 см^{-1} (Pistorius et al., 2009). В этой же области обнаружены и другие биомолекулярные остаточные спектральные компоненты. Она содержит полосы, связанные с $\text{PO}_2\text{-}$

симметричным растяжением фосфолипидов и спиральной основы ДНК, а также с вкладом неродственного неорганического Si-O-валентного колебания при 1075 см^{-1} . Сложно скомбинировать разрешение углеводной C-O-растягивающей колебательной связи, однако в нашем исследовании было обнаружено, что ярко выраженный характерный пик при 1056 см^{-1} хорошо коррелирует с содержанием углеводов в образцах биомассы (Wagner et al., 2010).

Кластерный анализ для дискриминации видов. Иерархический кластерный анализ (ИКА) представляет собой хемометрический метод, в котором спектральные данные были использованы для классификации спектров на основе их предсказанной гомологии и родства между видами, проанализированными с коэффициентом корреляции, изображенным при помощи алгоритма Уорда (Ward, 1963). *E. gracilis* демонстрировала большие спектральные расстояния (0.167229) по отношению к трем другим видам микроводорослей. Неожиданно представители рода *Chlorella* – *Ch. pyrenedosa* и *Ch. vulgaris*, оказались в разных кладах, тогда как *Ch. pyrenedosa* и *S. obliquus* показали очень близкое сходство (98,96%) и попали в одну кладу (рис. 2). Это, очевидно связано с физиологической реакцией на состав питательных веществ, что также показало филогенетическое дерево, полученное с использованием молекулярного маркера 16S рДНК.

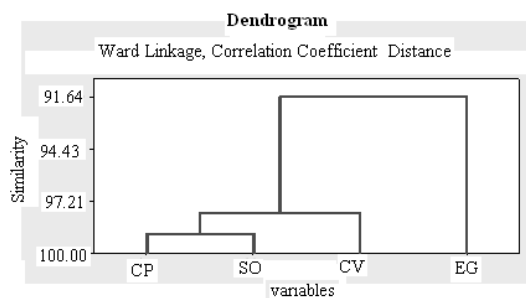


Рис. 2. Иерархическая кластерная дендрограмма, построенная по ИК-ПФ-спектральным данным видов микроводорослей

При сопоставлении микроводорослей для их идентификации оказалось, что различия в спектрах ИК-ПФ и последовательностях 16S рДНК у каждого из изученных видов проявляются по-своему (рис. 3). На филогенетическом дереве *Ch. pyrenedosa* и *S. obliquus* имели тесную связь, тогда как образцы *E. gracilis* четко отличались от всех других микроводорослей. Наше исследование показало способность спектрального анализа идентифицировать микроводоросли без использования каких-либо молекулярных маркеров. Однако есть

ограничение для культур, подвергшихся фенотипическим изменениям из-за недостатка питательных веществ. Это вызывает метаболические изменения, особенно в областях углеводов и липидов. Разрешение этих спектральных областей заметно изменится, что повлияет на структуру кластера.

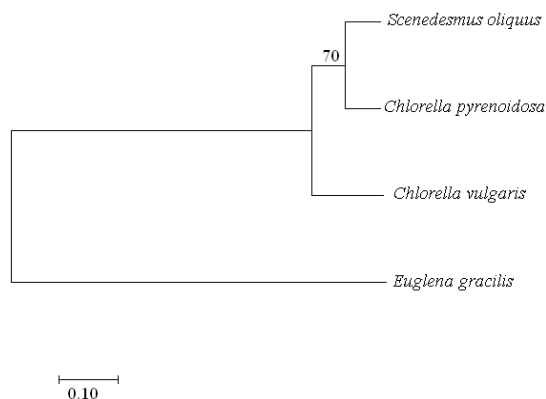


Рис. 3. Филогенетический анализ последовательностей 16S рДНК видов микроводорослей по Neighbour Joining method (значение бутстрэп – 1000 репликаций)

Определение биохимического состава клеток методом ИК-ПФ

В данном исследовании получена информация о биохимическом составе клеток микроводорослей с использованием ИК-ПФ. Сдвиги в положении пиков, изменение ширины полосы, интенсивности и величины площади инфракрасных полос используются для получения ценной структурной и функциональной информации об области полос поглощения, непосредственно связанных с концентрацией молекул. Спектральная количественная оценка на основе молекулярных колебаний микроводорослей приведена в табл. 2.

Для оценки состава липидов обычно рассматривают две области спектра: метильной и метиленовой групп при $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ и область колебательного растяжения сложноэфирных связей при 1740 см^{-1} . В нашем исследовании обнаружено лишь CH_2 -несимметричное растяжение липидов. Площадь пика липидов у *E. gracilis* составляла 0,97, что выше, чем у *S. obliquus*, *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa*.

Белковые пики были более выраженными, чем пики других макромолекул. Площади пиков группы Амид А у *S. obliquus* (138,7), *Ch. vulgaris* (83,09), *Ch. pyrenoidosa* (85,64) и *E. gracilis* (34,06) отражают более высокое поглощение *S. obliquus* по сравнению с другими видами микроводорослей, что непосредственно отражает более высокую концентрацию и интенсивность компонента Амид А в клетках этого вида. Группы Амид А, Амид I и Амид II считаются наиболее надежным регионом для количественного определения содержания белков в

биологических системах (Mayers et al., 2013). Сильные полосы поглощения при 3387 см⁻¹ и 1651 см⁻¹ доминируют в спектрах *S. obliquus* из других образцов (см. табл. 2). Эти регионы соответствуют белковым группам Амид А и Амид I. Площадь пика, имеющая отношение к соответствующей области полос поглощения, коррелирует с концентрацией молекул.

Таблица 2

Спектральные наблюдения, предполагающие количественное определение молекулярных колебаний (площадь пика) во всех видах микроводорослей

Волновое число, см ⁻¹	Молекулярные колебания	Интенсивность полос			
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Chlorella pyrenedosa</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Euglena gracilis</i>
3387	Амид А	138,17	85,64	83,09	34,06
2922	CH ₂ асимметричное растяжение липидов	0,55	0,87	0,80	0,97
1651	Амид I (C-O растяжение белков)	11,66	7,24	6,43	2,77
1548	Амид II (N-H сгибание, C-N растяжение)	0,97	1,66	0,50	0,80
1056	C-O растяжение углеводов	152,10	59,05	19,42	2,54

Таблица 3

Общее содержание белка в биомассе микроводорослей, определенное методом Брэдфорда и по ИК-ПФ-спектрам

Микроводоросль	Общий белок по методу Брэдфорда, мкг/мг сухой биомассы	Общий белок по площади спектральных пиков ИК-ПФ
<i>Scenedesmus obliquus</i>	1827	150,8
<i>Chlorella pyrenedosa</i>	1810	94,54
<i>Ch. vulgaris</i>	1051	90,02
<i>Euglena gracilis</i>	706	37,63

Плотность белков, определенная по ИК-ПФ-спектрам, отражает линейную зависимость от содержания белка в биомассе, рассчитанную методом М.М. Брэдфорда (Bradford, 1976), тем самым подтверждая результаты, полученные из ИК-ПФ (табл. 3).

Хорошо выраженный пик при 1056 см^{-1} отражает углеводный состав микроводорослей. Поглощение соответствует области C-O колебательного растяжения полосы (Giordano et al., 2001; Murdock, Wetzel, 2009). Образцы *S. obliquus*, *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenedosa* имели хорошо выраженные пики с разной площадью полосы. Площадь пика углеводов для *S. obliquus* была 152,10, что выше, чем у других видов. Интенсивность полосы *S. obliquus* обусловлена лимитированным содержанием фосфора при культивировании (Murdock, Wetzel, 2009).

Метод ИК-ПФ позволяет использовать минимальное количество материала для анализа. Так, 3–5 мг сухой биомассы достаточно для получения соответствующих спектров. При использовании традиционных «влажных» методов определения биохимического состава требуется не менее 50–100 мг. Наше исследование подтвердило, что метод ИК-ПФ обладает высокой воспроизводимостью и специфичностью для точной дифференциации близкородственных микроводорослей.

Заключение

ИК-ПФ-спектроскопия может быть использована для молекулярной идентификации микроводорослей с различными спектральными сигнатурами. Как ИК-ПФ-спектры, так и филогенетическое дерево по 16S рДНК показали аналогичный результат, подтверждающий, что по ИК-ПФ-спектрам можно различать виды водорослей. Внутривидовая изменчивость интенсивности полосы свидетельствует о том, что концентрации макромолекулярных соединений могут отличаться у различных штаммов. При сравнении образцов различных микроводорослей наибольшие спектральные изменения наблюдались в положении полос Амид А, Амид I, жирных кислот и полисахаридов. Виды отличались между собой также интенсивностью полос, которая была разной у полос, связанных с белками (Амид А и Амид I). Эти же количественные различия выявлены при определении белков традиционным биохимическим методом. Наши результаты показали, что спектры основных макромолекул могут использоваться для быстрой и точной дискриминации и идентификации микроводорослей.

Авторы благодарят Научно-исследовательский совет Департамента науки и техники при правительстве Индии за финансовую поддержку (грант SO:No/SB/FT/LS-389/2012) и Университет Карунья за предоставление условий для исследований. Также авторы хотели бы поблагодарить доцента Т. Р. Барат Кумара за критические замечания при подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72: 248.

- Cakmak G., Togan I., Severcan F. 17-Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 2006. 77: 53–63.
- de Moraes G.P., Vieira A.A.H. Fourier Transform Infrared with Attenuated Total Reflectance Applied to the Discrimination of Freshwater Planktonic Coccoid Green Microalgae. *PLoS One.* 2014. 9(12): 1–21.
- Dean A.P., Martin M.C., Sigeo D.C. Resolution of codominant phytoplankton species in a eutrophic lake using synchrotron-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Phycologia.* 2007. 46: 151–159.
- Dean A.P., Sigeo D.C., Estrada B., Pittman J.K. Using FT-IR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Biores. Technol.* 2010. 101: 4499–4507.
- Driver T., Bajhaiya A., Pittman, J.K. Potential of bioenergy production from microalgae. *Curr. Syst. Renew. Energy Rep.* 2014. 1: 94–103.
- Giordano M., Kansiz M., Heraud P., Beardall J., Wood B., McNaughton D. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetocerosmuellerii* (*Bacillariophyceae*). *J. Phycol.* 2001. 37: 271–279.
- Giordano M., Ratti S., Domenighini A., Vogt F. Spectroscopic classification of 14 different microalga species: first steps towards spectroscopic measurement of phytoplankton biodiversity. *Plant. Ecol. Divers.* 2009. 2: 155–164.
- Mayers J.J., Flynn K.J., Shields R.J. Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Biores. Technol.* 2013. 148: 215–220.
- Movasaghi Z., Rehman S., Rehmen I.U. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectroscop. Rev.* 2008. 43: 134–179.
- Murdock J.H., Wetzel D.L. FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2009. 44: 335–361.
- Naumann D., Labischinski H., Giesbrecht P. The characterization of microorganisms by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Modern techniques for Rapid Microbiological Analysis*. Weinheim; New York: VCH Verlag Chemie, 1991. P. 43–96.
- Pistorius M., DeGrip W.J., Egorova-Zachernyuk T.A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 2009. 103(1): 123–129.
- Sivakumar S., Sivasubramanian J., Chandra Prasad Khatiwada, Manivannan J., Raja B. Aluminium induced metabolic changes in kidney and heart tissue of mice: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *RSC Advanc.* 2013. 3: 20896–20904.
- Wagner H., Liu Z., Langner U., Stehfest K., Wilhelm C. The use of FT-IR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *J. Biophoton.* 2010. 3: 557–566.
- Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Stat. Assoc.* 1963. 58: 236–244.

Поступила 29 июня 2017 г.
Подписал в печать С.П. Вассер

Sureshkumar P.¹, Thomas J.¹, Sivasubramanian J.²

¹Algae Biomass Research Laboratory, Department of Biosciences & Technology, Karunya University, Karunya Nagar, Coimbatore 641114, India

²Assistant Professor, Department of Physics, The Madura College, Madurai 625011 Tamil Nadu, India

RAPID METHOD FOR SIMULTANEOUS DISCRIMINATION OF MICROALGAE AND DETERMINATION ON BIOCHEMICAL COMPOSITION BASED ON VIBRATIONAL SPECTROSCOPY

Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy is a high-resolution spectroscopic method used in whole-organism molecular fingerprinting. This analysis helps for the characteristic determination of macromolecular spectrum in intact cells. Spectral analysis can discriminate, classify, and identify the microorganisms as composition of macromolecules is different between strains of the same species. In the present investigation, four different microalgae were studied for their variations in spectral data, which showed striking differences on their major macromolecules. *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. have intense peaks in the lipids and protein spectral regions when compared to the other species. *Chlorella vulgaris* Beij., *Ch. pyrenedosa* Chick and *Euglena gracilis* Klebs possessed moderate and less intense peaks in sub sequential order in all the five spectral regions. Using FT-IR spectra, hierarchical clustering analyses resulted in a dendrogram with clear discrimination between species according to their phenotype variations. To support this, phylogenetic analysis using 16S rDNA microbial barcode sequences of these microalgal strains was evaluated and the resulting phylogram showed the same cluster pattern as revealed by FT-IR based dendrogram. Hence, this study concludes that the combination of phylogenetic analysis and the FT-IR spectra provides an effective way of distinguishing the species as well as the advantage of simultaneous determination of biochemical composition of the species.

Key words: FT-IR, microalgae, cluster analysis, phylogenetic analysis, species discrimination, fingerprint, biochemical composition