

**ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ****Маторин Д.Н.<sup>1</sup>, Братковская Л.Б.<sup>1</sup>, Алексеев А.А.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
ул. Ленинские горы, г. Москва, 119892, РФ<sup>2</sup> Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова  
г. Якутск, РФ; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию: 03.07.2018.

**Аннотация.** Проанализировано использование флуоресценции хлорофилла для изучения состояния водорослей и природного фитопланктона. Для оценки первичных стадий воздействия на фитопланктон предлагается использование световых и индукционных зависимостей флуоресценции, отражающих изменения в запасании энергии при фотосинтезе.

**Ключевые слова:** флуоресценции хлорофилла, водоросли, фитопланктон, фотосинтез, экология.

Водоросли определяют состояние и продуктивность водных экосистем. При действии различных экологических факторов и антропогенных загрязнений в первую очередь изменяются концентрация и фотосинтетическая активность клеток водорослей [1, 2]. Изменения фитопланктона приводят к изменениям в остальных звеньях водной экосистемы. Поэтому регистрация характеристик фитопланктона может являться способом оценки состояния водной среды в целом. Для быстрой диагностики физиологического состояния культур водорослей и фитопланктона используют различные методы регистрации флуоресценции хлорофилла, которые позволяют получать информацию о количестве и активности фотосинтезирующих организмов [3-10]. По характеристикам состояния фотосинтетического аппарата можно оценивать физиологическое состояние клеток при действии антропогенных факторов и судить о качестве водной среды. Важным преимуществом этих методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние объектов непосредственно в среде его обитания «*in situ*». Флуориметры используются для определения состояния культур водорослей при выращивании в разных биотехнологических условиях, при осуществлении мониторинга фитопланктона водоемов, для оценки степени чувствительности природных водорослей к повреждающим факторам среды.

Портативность и автономность приборов позволяет проводить измерения состояния водорослей как в лабораторных колбах и биореакторах, так и в природных условиях [2, 3]. Для выявления чувствительности водорослей к факторам среды необходимо воздействовать на них исследуемым фактором разной напряженности и зарегистрировать по параметрам флуоресценции ответную реакцию клеток на стресс, а также последующие реакции возвращения к норме после снятия стресса. При таких экспериментах можно регулировать дозовые и временные зависимости. Фотосинтетическая активность водорослей и природного фитопланктона зависит от световых условий, температуры и обеспеченности биогенными элементами, в первую очередь – азотом и фосфором. Освещенность и концентрация биогенных элементов в природных водах варьируют в широких пределах и в разных временных шкалах. За периодами высокого содержания в среде биогенных элементов следует снижение их концентрации в результате потребления фитопланктоном. Соответственно, после фазы обеспеченного минеральными веществами активного роста водорослей происходит снижение роста и фотосинтеза.

Современные представления о переносе электрона по фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) предполагают последовательное участие двух фотосистем (ФС II и ФС I), при котором переносчики, восстановленные ФС II, служат донорами электронов для ФС I. Электронный транспорт происходит в фотосинтетических мембранах и сопряжен с образованием электрохимического градиента протонов и синтезом АТФ. Одним из наиболее удобным методом, позволяющим получать информацию о протекании фотосинтетических процессов в интактных объектах в режиме реального времени, является флуоресценция хлорофилла. Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах водорослей, служит своего рода природным датчиком фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов флуоресценции. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтезе свете ( $F_m$ ) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата ( $F_0$ ) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов фотосистемы 2 (ФС2), которая равна  $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$ . Параметр  $F_v/F_m$  представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма [9]. Интенсивность флуоресценции  $F_0$  используют для оценки биомассы и скорости роста водорослей, а отношение  $F_v/F_m$  для оценки квантового выхода фотосинтеза, который является мерой физиологической активности водорослей. Значение  $F_v/F_m > 0,5$  указывает на высокую активность водорослей, а значение  $F_v/F_m < 0,5$  свидетельствует о неудовлетворительном состоянии водорослей. На основе флуоресценции на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработана «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом» (ФР.1.39.2011.11246, ПНДФ 14.2.268-2012). Методика допущена для целей государственного экологического контроля по разделу количественный химический анализ вод [3].

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей начинают использовать регистрацию световых кривых фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции, которые проводят на РАМ флуориметрах [2, 9]. Измерения световых зависимостей проводится при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 1500 мкмоль·м<sup>-1</sup>·с<sup>-2</sup>. В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности с использованием насыщающей вспышки (0,8 с, 3000 мкмоль квантов·м<sup>-1</sup>·с<sup>-2</sup>) регистрируются параметры  $F_M'$  и выход флуоресценции на свету  $F_{(t)}$ . На основании измеренных уровней флуоресценции рассчитывали следующие параметры:  $F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M$  - максимальный квантовый выход разделения зарядов в ФС II;  $Yield = (F_M' - F_t)/F_M'$  - эффективный квантовый выход в ФС II на свету;  $NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$  - нефотохимическое тушение флуоресценции и  $gETR = Yield \cdot 0,5 \cdot E_1$  - относительная скорость электронов по электрон-транспортной цепи, где  $E_1$  – освещенность (мкмоль квантов·м<sup>-1</sup>·с<sup>-2</sup>). Из световой кривой ( $\alpha$ ), рассчитывают: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой ( $\alpha$ )), максимальную относительную скорость электронов по электрон-транспортной цепи ( $ETR_{max}$ ) и насыщающую интенсивность света ( $E_n = ETR_{max}/\alpha$ ) [9, 10].

Кроме этого активно развиваются методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) при возбуждении интенсивным светом [3, 5, 6, 8]. Измерение индукционных кривых флуоресценции с высоким разрешением занимает всего несколько секунд и проводится на приборах типа РАМ и РЕА. На приборе М-РЕА2 появилась возможность наряду с регистрацией флуоресценции измерять изменения поглощения  $P_{700}$  (пигмента ФС1). То есть прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями ФС1 и ФС2 [8]. Более того, прибор регистрирует индукционные изменения замедленной флуоресценции, которые дают информацию о кинетике электрохимического градиента протонов на фотосинтетической мембране.

В настоящее время активно развивается космический мониторинг морей и океанов, но он позволяет получать информацию только с поверхности моря. При этом регистрируется температура или цветность моря. Однако важно определять процессы, происходящие в толще воды. Единственными методами, позволяющими следить за живыми организмами в режиме реального времени, являются флуоресценция фитопланктона и биолюминесценция.

Для работ с фитопланктоном в природных условиях разработан ряд устройств для зондирования его флуоресценции. Существуют приборы, в которых флуоресценция возбуждается естественным освещением, однако в большинстве флуориметров применяется искусственное возбуждение постоянным или импульсным освещением. Для контактного зондирования флуоресценции могут быть использованы флуориметры, помещенные на борт судна или лодки, с применением отбора проб или проточных кювет, через которые посредством шланга или помпы непрерывно прокачивается вода, что позволяет осуществлять непрерывную запись флуоресценции. Проточные флуориметры отличаются простотой и надежностью. Однако одним из недостатков проточных флуориметров является некоторое искажение профилей флуоресценции при зондировании за счет протяженности шлангов для подачи воды и трудности привязки отсчетов флуоресценции к значениям глубины.

Использование проточного флуориметра позволяет также проводить измерения содержания хлорофилла фитопланктона приповерхностных вод по ходу судна или вести непрерывный контроль этого показателя в течение длительного времени с платформы. Получаемая информация может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме. В настоящее время некоторыми фирмами выпускается аппаратура для измерения флуоресценции фитопланктона в воде (фирмы TURNER DESIGNS ([www.fluorometer.com](http://www.fluorometer.com)), ВВЕ Kiel (Германия) ([www.bbe-moldaenke.de](http://www.bbe-moldaenke.de)), Neil Broun ([www.neilbroun.com](http://www.neilbroun.com)) и некоторые другие).

Для измерения фотосинтетических параметров фитопланктона на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработан комплекс портативных приборов, включающих бортовой флуориметр, погружной и проточный флуориметры [3, 11]. Малогабаритный импульсный погружной зонд-флуориметр позволяет измерять параметры флуоресценции фитопланктона ( $F_0$ ,  $F_v/F_m$ ), температуру и подводную освещенность [11, 13]. Определение величин  $F_0$  и  $F_v/F_m$  позволяет выявить ситуации, когда в водоемах имеется много фитопланктона ( $F_0$  велико), однако, его активность и продукция невелика в силу неблагоприятных условий. На основании этих данных можно получить сравнительную информацию о распределении как самого фитопланктона ( $F_0$ ), так и его фотосинтетической активности ( $F_v/F_m$ ) по глубине и горизонтальным разрезам в водоемах и рассчитать фотосинтетическую продукцию с использованием величин подводной освещенности [4].

С помощью этого флуориметра может быть получена информация об экологическом состоянии разных водоемов, построены глубинные разрезы (до 150 м) и трехмерные карты распределения количества и активности фитопланктонных сообществ, температурных и оптических параметров водной среды и выявлены районы, подверженные антропогенному загрязнению. Чрезвычайно важной областью является использование подобной аппаратуры для биомониторинга влияния загрязнений на фитопланктонные популяции в природных водоемах, определения границ этого влияния и качества среды.

Проточный флуориметр также выполняет в автоматическом режиме измерения параметров флуоресценции  $F_0$  и  $F_v/F_m$  фитопланктона по ходу судна [2, 3]. Для протока воды использовали водоструйный насос, размещенный за измерительной камерой прибора, что обеспечивало нативность клеток водорослей. Скорость протока воды равнялась 0,5 л/мин, время прохождения воды по шлангу до измерительной камеры составляло менее 2 мин. Проточный флуориметр оснащен датчиком GPS для определения и регистрации координат и

времени. Регистрация всех измеренных величин и управление прибором проводили по разработанной нами программе, позволяющей визуализировать и запоминать всю полученную информацию.

Применяя погружной и проточный флуориметры нами было проведено зондирование состояния водной среды в Черном, Каспийском, Средиземном, Норвежском и Южно-Китайском морях, озерах Байкал и Иссык-Куль [2, 11-14]. В частности, с использованием разработанного комплекса нами совместно с польскими океанологами было охарактеризовано современное состояние фитопланктона южной части Балтийского моря (район Гданьска). Это позволило построить карты распределения фитопланктона и его активности по акватории и глубине Балтийского моря.

Разработанный комплекс может быть включен основанием для создания системы мониторинга экологического состояния различных прибрежных вод. Такая система позволит контролировать текущее состояние фитопланктонного сообщества, выработать рекомендации по рациональному природопользованию и природно-охранным мероприятиям. Это направление интенсивно развивается в настоящее время и несомненно ему принадлежит большое будущее, поскольку оно обеспечивает раннюю экспресс-диагностику экологического состояния водоемов в режиме реального времени и стыковку космического и наземного зондирования.

#### **Список литературы / References:**

1. Falkowski P.G., Raven J.A. *Aquatic photosynthesis*. Malden: Blackwell Science, 1997, 375 p.
2. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей*. М., Ижевск: Изд-во ИКИ-РХД, 2012, 256 с. [Matorin D.N., Rubin A.B. *Chlorophyll fluorescence in higher plants and algae*. М.: ИКИ-РХД, 2012, 256 p. (In Russ.)]
3. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. *Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты*. Учебно-методическое пособие. М.: Альтрекс, 2012, 138 с. [Matorin D.N., Osipov V.A., Rubin, A.B. *Methods for measurement of phytoplankton abundance and indication of its varying state in natural waters by the fluorescent method. theoretical and applied aspects*. М: Al'treks, 2012, 138 p. (In Russ.)]
4. Antal T.K., Venediktov P.S., Matorin D.N., Ostrowska M., Wozniak B., Rubin A.B. Measurement of phytoplankton photosynthesis rate using a pump-and-probe fluorometer. *Oceanologia*, 2001, vol. 43 (3), pp. 291-313.
5. Antal T. K., Matorin D.N., Ilyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.A., Konyuhov I.V., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer. *Photosynthesis Res.*, 2009, vol. 102, pp. 67-76.
6. Antal T.K., Osipov V.A., Matorin D.N., Rubin A.B. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic electron transport in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 2011, vol. 102, pp. 169-173.
7. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae. *Oceanologia*, 2004, vol. 46 (4), pp. 519-531.
8. Ouakroum A., Goltsev V., Strasser R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection. *PLoS one*, 2013, vol. 8, no. 3, pp. 1-10.
9. Schreiber U. Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: *Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*. Papageorgiou G. and Govindjee (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 279-319.
10. Herlory O., Richard P. Blanchard G.F. Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. *Mar. Biol.*, 2007, vol. 153, pp. 91-101.
11. Matorin D.N., Venediktov P.S., Konev Yu.V., Rubin A.B. Application of a double-flash, impulse, submersible fluorimeter in the determination of photosynthetic activity of natural phytoplankton. *Doklady Russ. Acad. Sci., Earth Sci. Sect.*, 1996, vol. 350 (7), pp. 1159-1161.
12. Fadeev V.V., Filippova E.M., Maslov D.V., Matorin D.N. Diagnostics of photosynthesising organisms by linear and non-linear fluorimetry. *Proc. Of SPIE*, 1999, vol. 3821, pp. 248-259.
13. Ostrowska M., Majchrowski R., Matorin D.N. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part1: Theory of classical in situ chlorophyll fluorometry. *Oceanologia*, 2000, vol. 42 (2), pp. 203-219.
14. Ostrowska M., Matorin D.N., Ficek D. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 2: fluorometric method of chlorophyll a determination. *Oceanologia*, 2000, vol. 42 (2), pp. 221-229.

## FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL FOR ASSESSING THE STATE OF ALGAE

Matorin D.N.<sup>1</sup>, Bratkovskaja L.B.<sup>1</sup>, Alekseev A.A.<sup>2</sup><sup>1</sup> Moscow State University*Vorobyevi Gory, 119892, Moscow, Russia*<sup>2</sup> North-Eastern Federal University*Yakutsk, Russia; e-mail: matorin@biophys.msu.ru*

**Abstract.** The use of fluorescence of chlorophyll for the study of the state of algae and natural phytoplankton has been analyzed. To assess the primary stages of the effect on phytoplankton, it is proposed to use light and inductive fluorescence dependencies that reflect changes in energy storage during photosynthesis.

**Key words:** *chlorophyll fluorescence, algae, phytoplankton, photosynthesis, ecology.*