КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КРАСНОЙ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* У ДИНОФИТОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Л.В. Стельмах, И.М. Мансурова

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О.Ковалевского РАН»,
РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2
E-mail: lustelm@mail.ru; ira.mansurova2013@yandex.ua

Предложен подход к исследованию красной автофлуоресценции хлорофилла *a* у динофитовых водорослей с использованием зеленого света для возбуждения данного процесса. Это позволяет дать количественную оценку флуоресценции не только в целом для всей искусственной популяции динофитовых водорослей, но и для отдельных ее клеток. С помощью предложенного подхода выявлена высокая степень гетерогенности функционального состояния динофитовых водорослей в стационарной фазе их роста на примере культуры *Prorocentrum micans*. В логарифмической фазе роста функциональная активность отдельных клеток исследуемого вида водорослей изменялась в довольно узких пределах.

Ключевые слова: динофитовые водоросли, автофлуоресценция хлорофилла *a*, люминесцентная микроскопия.

Поступила в редакцию: 30.07.2019. После доработки: 25.09.2019.

Введение. Оценка функционального состояния фитопланктона Черного моря и отдельных его видов представляется крайне актуальной при исследовании влияния климата и антропогенного фактора на состояние черноморской экосистемы и прогнозировании возможных путей ее развития в ближайшем будущем. Изменения в отдельных компонентах экосистемы, и прежде всего в фитопланктоне, могут происходить не только на уровне крупных таксонов, но и на уровне отдельных видов и их популяций. Поэтому новое поколение междисциплинарных исследований должно объединять лабораторные результаты и полевые данные как основу моделирования и прогнозирования изменений в экосистемах водоемов [1].

Основными функциональными характеристиками, используемыми в последние годы в исследованиях фитопланктона Черного моря и микроводорослей в культурах, являются удельная скорость роста и относительная переменная флуоресценция хлорофилла [2–5]. Удельное содержание хлорофилла *a* в расчете на единицу органического угле-

рода или на клетку относится к структурным параметрам водорослей, однако этот параметр, быстро реагируя на изменения условий среды, также отражает и их функциональное состояние [6]. Указанные параметры представляют собой усредненные характеристики суммарного фитопланктона, либо отдельных его видов в культурах. Однако известно, что фитопланктонное сообщество, а также отдельные его представители характеризуются определенной степенью гетерогенности не только структурных, но и функциональных характеристик. Для ее выявления необходимо использовать методы, позволяющие оценивать структурные и функционирование особенности отдельных клеток водорослей. К таким методам относится люминесцентная микроскопия, с помощью которой можно регистрировать свечение отдельных клеток и использовать его для оценки функционального состояния микроводорослей.

Одной из основных таксономических групп морского фитопланктона являются динофитовые водоросли, которые могут функционировать длительное время при

неблагоприятных условиях среды, например при крайнем недостатке биогенных веществ [7]. Мы полагаем, что гетерогенность функциональных свойств клеток этих водорослей даже в пределах одной популяции позволяет некоторой ее части выживать в условиях ограниченных ресурсов и прежде всего, таких как свет и биогенные вещества. Использование люминесцентной микроскопии в комплексе с другими методами оценки структурных и функциональных параметров микроводорослей позволит расширить наши знания по физиологии динофитовых.

Цель настоящей работы состояла в обосновании предложенного авторами методического подхода к количественной оценке красной автофлуоресценции хлорофилла *a* у динофитовых водорослей на примере черноморского вида *Prorocentrum micans*.

Материал и методы. Объектом исследования явилась альгологически чистая культура микроводоросли *Prorocentrum micans* Ehrenberg (Dinophyta), выделенная из планктона Черного моря и содержащаяся в коллекции отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН». Этот вид является одним из наиболее массовых видов фитопланктона Черного моря, хорошо развивается в условиях культуры, а поэтому часто используется в экспериментальных исследованиях.

Накопительную культуру экспонировали в двух колбах объемом 150 мл каждая с использованием питательной среды *f/2* при насыщающей рост данного вида интенсивности непрерывного света ($80 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Источником света служили светодиодные лампы, расположенные снизу световой решетки. Температура воды в экспериментах была оптимальной для развития данного вида и составляла 22°C .

Оценку концентрации хлорофилла *a*, численности клеток водорослей, эффективности работы фотосистемы 2 и оптической плотности культуры, а также ре-

гистрацию красной автофлуоресценции хлорофилла *a* выполняли в логарифмической и стационарной фазах роста культуры.

Для определения концентрации хлорофилла *a* из каждой колбы с культурой отбирали аликвоты объемом 2–14 мл в двух повторностях и осаждали на мембранные фильтры типа Sartorius с диаметром пор 0,8 мкм. Фильтры помещали в раствор 90% ацетона. Экстрагирование пигментов осуществлялось в течение 12 часов при температуре 8°C . Концентрацию хлорофилла *a* определяли флуориметрическим методом с использованием лабораторного флуориметра, калибровку которого осуществляли по чистому хлорофиллу *a* [8]. Оптическую плотность культуры на длинах волн 500 и 673 нм измеряли на фотоколориметре КФК-2 с использованием кювет объемом 20 мл в двух повторностях.

Оценку фотохимической эффективности фотосистемы 2 (F_v/F_m) микроводорослей осуществляли на двухвспышечном флуориметре, принцип работы и устройство которого разработаны на кафедре биофизики биологического факультета МГУ [9]. Измерения проводили после 30 минут адаптации водорослей к темноте, чтобы все реакционные центры фотосистемы 2 перешли в открытое состояние. Во флуориметре реализован метод измерения начального уровня переменной флуоресценции (F_0) при помощи коротких зондирующих вспышек и ее максимального уровня (F_m) при помощи насыщающей вспышки. По измеренным показателям рассчитывали переменную флуоресценцию $F_v = F_m - F_0$ и фотохимическую эффективность фотосистемы 2 (F_v/F_m). Относительная погрешность определений величины F_v/F_m не превышала 5%.

Для учета численности клеток водорослей в светлом поле и регистрации красной автофлуоресценции хлорофилла *a* в темном поле использовали световой микроскоп Микромед 3ЛЮМ. Дополнительно микроскоп оснащен флуоресцентным блоком с ртутной лампой мощ-

ностью 100 Вт и фотокамерой TourCam UCMOS 14000 КРА. Для возбуждения красной автофлуоресценции хлорофилла *a* использовали синий и зеленый светофильтры (диапазон возбуждения флуоресценции 410–490 и 500–550 нм соответственно). Наблюдение свечения объекта (в отраженном свете) после прохождения через запирающие светофильтры (515 и 590 нм) производилось в двух областях: 515–700 и 590–700 нм. Определение цветовых и яркостных характеристик светящихся клеток *P. micans* осуществляли с помощью программы Adobe Photoshop, которая ранее применялась при измерении цветовых характеристик зоопланктона Черного моря [10]. Каждую клетку водорослей анализировали отдельно. Всю светящуюся область клетки выделяли с помощью инструмента Lasso Tool, осредняли ее яркостные и цветовые характеристики, а затем проводили их измерение. Осреднение выполняли с помощью фильтра «Среднее размытие» (меню Filter – Blur – Average), а измерение яркостных и цветовых характеристик проводилось с помощью инструмента «Пипетка» (Eyedropper Tool). Количественную оценку свечения оценивали с использованием показателя В (яркость) в модели HSB (H – цветовой тон, S – насыщенность, В – яркость) данной программы. Он может изменяться от 0 до 100% и свидетельствовать об интенсивности флуоресценции отдельных клеток микроводорослей.

Удельную суточную скорость роста микроводорослей рассчитывали по приросту численности клеток в пробах по уравнению

$$\mu = \ln(N_t - N_0),$$

где μ – удельная скорость роста водорослей, сут⁻¹; N_0 и N_t – исходная численность клеток и их количество через сутки.

Статистическая обработка данных выполнена в программе Excel 2007, построение графиков осуществлялось в программе Grafer 3 для Windows.

Результаты и обсуждение. Микроводоросли, как и другие фотоавтотрофные организмы, содержат основной фотосинтетически активный пигмент – хлорофилл *a*. Ему свойственна собственная флуоресценция в красной области спектра, так называемая красная автофлуоресценция, для возбуждения которой обычно используют синий свет. Однако в отличие от зеленых и диатомовых видов водорослей, у динофлагеллят удельное содержание хлорофилла *a* в несколько раз меньше даже при достаточном уровне биогенных веществ в среде [11]. В условиях их дефицита содержание хлорофилла *a* снижается приблизительно в 3 раза, как у диатомовых водорослей, так и у динофитовых [12]. По этой причине красная автофлуоресценция хлорофилла *a* при ее возбуждении синим светом сильно ослабевает и, прежде всего, у динофитовых водорослей. Как следует из рис. 1, в логарифмической фазе роста культуры *P. micans* флуоресценция хлорофилла *a*, вызванная синим светом и регистрируемая в красной области спектра, достаточно слабая. В стационарной фазе роста водорослей, когда, вероятно, имеет место дефицит одного из субстратов (например, биогенных веществ), флуоресценция хлорофилла *a* под действием синего света почти не регистрировалась.

Расчеты показали, что в исследуемой культуре водорослей при возбуждении флуоресценции хлорофилла *a* синим светом ее интенсивность в среднем в 3 раза ниже, чем под действием зеленого света. Динофитовые водоросли, помимо хлорофиллов *a* и *c* содержат каротиноиды, основным из которых является пигмент-маркер – перидинин, поглощающий световую энергию в сине-зеленой области спектра (470–550 нм). Вместе с другими каротиноидами и хлорофиллами *a* и *c* он входит в состав светособирающего комплекса клеток динофлагеллят. Перидинин – хлорофилл *a* – белковый комплекс динофитовых водорослей, в отличие от светособирающих антенных систем других групп водорослей,

Рис. 1. Клетки *P. micans* под световым микроскопом (а), флуоресценция хлорофилла *a* клеток при их облучении синим (б) и зеленым (в) светом, общее увеличение системы – 400 крат.

Верхний ряд – культура в логарифмической фазе роста, нижний – в стационарной фазе

Fig. 1. *P. micans* cells under a light microscope (a), fluorescence of chlorophyll *a* cells when they are irradiated with blue (b) and green (c) light, the total increase of the system is 400 times.

The upper row is the culture in logarithmic growth phase, the lower one is in stationary phase

в которых преобладает хлорофилл *a*, характеризуется доминированием перидинина в качестве основного поглощающего свет пигмента [13]. Энергия света, поглощенная перидином, затем передается на хлорофилл *a*, однако механизм этой передачи окончательно не ясен [14].

Присутствие каротиноидов в клетках водорослей проявляется в наличии «плеча» в спектрах поглощения света *in vivo* на длине волны 500 нм. У исследуемого нами вида *P. micans* соотношение между оптической плотностью на этой длине волны и на 673 нм в различных фазах роста культуры постоянно и составило 1,196 (рис. 2).

Следовательно, при постоянных температурных условиях и снижении обеспеченности водорослей одним из основных субстратов роста, вызывающим перестройку функционального состояния

клеток, количество хлорофилла *a* и каротиноидов в них изменяется однонаправленно и пропорционально. Это позволяет использовать для возбуждения красной автофлуоресценции хлорофилла *a* у динофитовых водорослей не только синий свет, но и зеленый (поглощение света пигментами около 500 нм).

Энергия света, поглощенная каротиноидами в зеленой области спектра, с высокой эффективностью транспортируется на хлорофилл *a*. Небольшая часть этой энергии участвует в процессе фотосинтеза, а основная ее доля рассеивается в виде теплового излучения или расходуется на флуоресценцию. При этом изменение интенсивности флуоресценции будет пропорционально изменению концентрации хлорофилла *a*, что подтверждается полученными в данном исследовании результатами (табл. 1).

Рис. 2. Зависимость между поглощением света каротиноидами и хлорофиллом *a* в культуре *P. micans* в состоянии *in vivo*: D_{500}, D_{673} – оптическая плотность культуры при длине волны 500 нм (каротиноиды) и её значения при 673 нм (хлорофилл *a*)

Fig. 2. The relationship between light absorption by carotenoids and chlorophyll *a* in culture of *P. micans* *in vivo*: D_{500}, D_{673} – optical density of the culture at wavelength of 500 nm (carotenoids) and its values at 673 nm (chlorophyll *a*)

Таблица 1. Концентрация хлорофилла *a*, интенсивность его флуоресценции и отношение F_v/F_m в различных фазах роста культуры *P. micans*

Фазы роста культуры	Интенсивность флуоресценции хлорофилла <i>a</i> , % яркости		$X_{cl} a \cdot 10^{-3}$, $мкг \cdot кл^{-1}$	F_v/F_m , отн. ед.
	Среднее значение для всей популяции	Пределы значений для отдельных клеток		
Поздняя логарифмическая	$24 \pm 7^*$	13–33	$9,42 \pm 0,80^*$	$0,42 \pm 0,02^*$
Начальная стационарная	12 ± 5	5–22	$7,98 \pm 0,80$	$0,37 \pm 0,02$
Поздняя стационарная	9 ± 6	1–25	$4,15 \pm 0,50$	$0,25 \pm 0,01$

Примечание. * – приводится стандартное отклонение среднего значения.

Интенсивность автофлуоресценции хлорофилла *a* у *P. micans*, вызванной зеленым светом, была неодинакова на различных стадиях роста накопительной культуры. В поздней логарифмической фазе она составляла в среднем 24% яр-

кости, тогда как в начальной стационарной фазе снизилась в 2 раза, а в поздней стационарной фазе роста была в 2,7 раза меньше исходного значения. К концу эксперимента одновременно наблюдалось снижение концентрации хлорофил-

ла *a* в клетках в 2,3 раза и относительной переменной флуоресценции в 1,7 раза. Следовательно, по мере замедления роста исследуемой культуры и усиления дефицита биогенных веществ в среде происходит снижение функциональной активности клеток водорослей и содержания в них основного фотосинтетического пигмента – хлорофилла *a*. В отличие от последних двух параметров, которые представляют собой средневзвешенные характеристики исследуемой культуры, интенсивность автофлуоресценции хлорофилла *a* проанализирована нами не только для всей популяции водорослей, но и для каждой ее отдельной клетки. Как видно, этот параметр неодинаков в разных клетках в пределах данной культуры. В поздней логарифмической фазе роста *P. micans* интенсивность флуоресценции отдельных клеток водорослей различалась в 2,5 раза, тогда как в ранней стационарной фазе – в 4,4 раза, а в поздней стационарной – в 25 раз (табл. 1). Иными словами, по мере роста накопительной культуры гетерогенность автофлуоресценции хлорофилла *a* в отдельных клетках водорослей усиливается и достигает максимума в конце стационарной фазы роста. Это может свидетельствовать о высокой степени неоднородности функционального состояния и жизнеспособности клеток исследуемого вида микроводорослей.

Заключение. Использование зеленого света для возбуждения собственной флуоресценции хлорофилла *a* у динофитовых водорослей оказалось возможным благодаря наличию у них в светособирающих антеннах перидинина. У данной группы водорослей он является основным светособирающим пигментом, передающим поглощенную световую энергию на хлорофилл *a*. Это позволяет усилить автофлуоресценцию хлорофилла и оценить ее количественно в отдельных клетках водорослей. На основе такого подхода выявлена гетерогенность функционального состояния клеток динофитовой водоросли *P. micans*, которая уси-

ливается по мере роста накопительной культуры и ее перехода в стационарную фазу.

Работа выполнена по теме государственного задания ФИЦ ИнБЮМ № 0828-0003 «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом» (номер гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) в рамках деятельности Научно-образовательного центра коллективного пользования "Коллекция гидробионтов Мирового океана ИнБЮМ", поддержанная программой развития биоресурсных коллекций Минобрнауки. Составной частью этой коллекции являются живые культуры микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mieszkowska N.* Multinational, integrated approaches to forecasting and managing the impacts of climate change on intertidal species / N. Mieszkowska, L. Benedetti-Cecchi, M.T. Burrows [et al.] // Marine Ecology Progress Series, 2019. Vol. 613. P. 247–252.
2. *Использование* переменной флуоресценции хлорофилла *in vivo* для оценки функционального состояния фитопланктона / Л.В. Стельмах, Е.А. Куфтаркова, А.И. Акимов [и др.] // Системы контроля окружающей среды. 2010. Вып. 13. С. 263–268.
3. *Мансурова И.М.* Влияние света на удельную скорость роста динофитовых водорослей Чёрного моря // Морской экологический журнал. 2013. Т. 12. № 4. С. 73–78.
4. *Цилинский В.С., Суслин В.В., Финенко З.З.* Сезонная динамика эффективности работы фотосинтетического аппарата фитопланктона в прибрежных районах Черного моря // Океанология. 2018. Т. 58. № 4. С. 593–600.

5. Stelmakh L., Gorbunova T. *Emiliania huxleyi* blooms in the Black Sea: influence of abiotic and biotic factors // *Botanica*, 2018. Vol. 24, No. 2. P. 172–184.
6. Geider R.J. Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton // *New Phytologist*, 1987. Vol. 106. P. 1–34.
7. Aldridge D., Purdie D.A., Zubkov M.V. Growth and survival of *Neoceratium hexacanthum* and *Neoceratium candellabrum* under simulated nutrient-depleted conditions // *Journal of Plankton Research*, 2013. Vol. 36, No. 2. P. 439–449.
8. *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements*. JGOFS Report Nr. 19, vi+170 pp. Reprint of the IOC Manuals and Guides No. 29, UNESCO 1994 / Knap, A., Michaels, A., Close, A., Ducklow, H., Dickson, A. (eds.). 1996.
9. Применение флуориметра «Мега-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата / С.И. Погосян, С.В. Гальчук, Ю.В. Казимирко [и др.] // *Вода: химия и экология*. 2009. № 6 (12). С. 34–40.
10. Литвинюк Д.А. Морской зоопланктон и методические проблемы его изучения. Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва. 2015. 27 с.
11. Geider R.J., MacIntyre, H.L., Kana, T.M. Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of the balanced growth rate and the chlorophyll *a* : carbon ratio to light, nutrient limitation and temperature // *Marine Ecology Progress Series*, 1997. Vol. 148. P. 187–200.
12. Стельмах Л.В. Функциональное состояние и некоторые структурные характеристики морских планктонных водорослей при разном уровне обеспеченности биогенными веществами // *Вопросы современной альгологии*. 2018. № 1 (16). URL: <http://algology.ru/1252>
13. Polívka T., Hiller R.G., Frank H.A. Spectroscopy of the peridinin-chlorophyll-*a* protein: insight into light-harvesting strategy of marine algae // *Archives of biochemistry and biophysics*, 2007. Vol. 458, No. 2. P. 111–120.
14. *The Unique Photophysical Properties of the Peridinin-Chlorophyll-*a*-Protein* / Carbonera, D., Di Valentin, M., Spezia, R. [et al.] // *Current Protein and Peptide Science*, 2014, Vol. 15, No. 4. P. 332–350.

QUANTIFICATION OF RED AUTO-FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL *a* IN DINOFLAGELLATES BY LUMINESCENT MICROSCOPY

L.V. Stelmakh, I.M. Mansurova

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS,
RF, Sevastopol, Nakhimov Av., 2

An approach to study red autofluorescence of chlorophyll *a* in dinoflagellates using green light to excite this process is proposed. This allows us to quantify fluorescence not only in general for the entire artificial population of dinoflagellates, but also for its individual cells. Using the proposed approach, a high degree of heterogeneity of the functional state of dinoflagellates in the stationary phase of their growth using the *Prorocentrum micans* culture as an example was revealed. In the logarithmic growth phase, the functional activity of individual cells of the studied algae species varied within rather narrow limits.

Keywords: dinoflagellates, autofluorescence of chlorophyll *a*, luminescent microscopy.