

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕМЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *IN VIVO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФИТОПЛАНКТОНА

Л.В. Стельмах, Е.А. Куфтаркова,  
А.И. Акимов, И.И. Бабич,  
А.Б. Кохемяка

Институт биологии южных морей  
НАН Украины,  
г. Севастополь, пр. Нахимова, 2  
E-mail: lstelm@ibss.iuf.net

*Представлены результаты одновременных измерений относительной переменной флуоресценции ( $F_v/F_m$ ) и удельной скорости роста морских микроводорослей в культурах и в фитопланктоне прибрежных вод Черного моря у Севастополя. Выявлена количественная связь между этими параметрами. Показана возможность экспресс-оценки удельной скорости роста фитопланктона по величине  $F_v/F_m$ .*

**Введение.** Для быстрой диагностики функционального состояния морского фитопланктона, в частности, оценки его фотосинтетической активности в последние двадцать пять лет в мировой гидробиологической практике успешно используют метод регистрации переменной флуоресценции хлорофилла *in vivo* [1 – 5]. Переменная флуоресценция связана с активностью реакционных центров фотосистемы 2 (ФС2), где осуществляются световые реакции фотосинтеза. В ряде работ показано, что эффективность этих реакций зависит от факторов среды, и прежде всего, от света и содержания биогенных веществ в воде [1, 3, 5, 6]. Последние оказывают большое влияние на такой функциональный показатель фитопланктона, как удельная скорость роста [7]. Можно предположить, что между скоростью роста и переменной флуоресценцией микроводорослей существует количественная связь. Если это так, то по относительной переменной

флуоресценции можно судить не только об уровне обеспеченности фитопланктона биогенными веществами, но и о величине его удельной скорости роста.

Цель настоящей работы – выявить количественную связь между удельной скоростью роста и величиной относительной переменной флуоресценции в культурах морских микроводорослей и в фитопланктоне прибрежных вод Черного моря.

**Материал и методика.** Объектом исследования служили альгологически чистые культуры диатомовых водорослей *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros socialis*, *C. curvisetus*, *C. peruvianus*, *Coscinodiscus granii*, *Pseudo-nitzschia seriata* и *Ditylum brightwellii*, а также динофитовых водорослей *Prorocentrum micans*, *P. cordatum*, *Ceratium tripos* и *Glenodinium foleaceum*, представленных в коллекции отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ. Водоросли культивировали на среде f/2. Культуры помещали на 5 различных интенсивностей непрерывного света (от 40 до 400 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>), адаптировали в течение 3–5 суток к каждой интенсивности, поддерживая их в фазе логарифмического роста за счет разбавления свежей питательной средой. Затем для каждой интенсивности света рассчитывали удельную скорость роста. Ее максимальные значения наблюдались при 120 – 400 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. В этих условиях водоросли выращивали в течение 5 – 7 дней в накопительном режиме. Каждые сутки в одной и то же время (в 12 часов) осуществляли измерение линейных размеров клеток под световым микроскопом ZEISS Primo Star в 25 повторностях, учет их численности в трех повторностях. Относительная ошибка определения численности клеток не превышала 10 %. Удельную скорость роста микроводорослей рассчитывали по приросту численности клеток в экспериментальных сосудах по уравнению:

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

где  $t$  – время в сутках;  $N_0$  и  $N_t$  – исходная численность клеток и их количество через время  $t$ .

Для определения содержания органического углерода и азота в клетках отбирали пробы объемом 100 – 150 мл в 2-х повторностях, фильтровали через фильтры GF/F и сжигали в CHN-анализаторе [8]. Относительная ошибка определения азота и углерода составляла 10 – 12 %.

Отбор проб фитопланктона выполняли в прибрежных поверхностных водах Черного моря на трех станциях в районе Севастополя: в Севастопольской бухте и Кантильной, а также в открытом прибрежье в районе б. Круглая, на двух станциях в бухте Ласпи и двух станциях у поселка Кацивели. Измерение удельной скорости роста фитопланктона выполняли с помощью метода разведения проб, который описан нами подробно ранее [7]. Определение видового состава, численности и линейных размеров клеток фитопланктона осуществляли в сгущенной капле объемом 0,1 мл в трех повторностях с помощью светового микроскопа ZEISS Primo Star. Гидрохимические анализы выполняли стандартными методами [9].

Измерения относительной переменной флуоресценции ( $F_v/F_m$ ) проводили на двухвспышечном флуориметре, изготовленном в отделе экологической физиологии водорослей ИнБЮМ одним из соавторов данной работы Акимовым А. И. Устройство и принцип работы двухвспышечного флуориметра разработаны ранее на кафедре биофизики биологического факультета МГУ [1, 2]. Базовый принцип двухвспышечной флуориметрии заключается в сравнении интенсивностей флуоресценции, индуцируемых световыми импульсами в двух вариантах. В первом варианте измеряется флуоресценция, вызываемая только тестирующими вспышками слабой интенсивности, при которой реакционные центры (РЦ) фотосистемы 2 не загружены и остаются открытыми ( $F_0$ ). Во втором варианте каждая тестирующая вспышка предваряется достаточно длительным световым импульсом высокой интенсивности, который полностью насыщает реакционные центры и перево-

дит их в закрытое состояние. Это вызывает высыпывание возбужденных состояний молекул-светосборщиков (хлорофилла *a*), так как отсутствует возможность фотохимической утилизации этой энергии. В результате флуоресценция возрастает ( $F_m$ ). Разность максимального и минимального значений выхода флуоресценции ( $F_v = F_m - F_0$ ), так называемая переменная флуоресценция, пропорциональна той части энергии света, которая используется в фотохимических реакциях фотосинтеза в условиях открытых РЦ ФС 2.

Считается, что отношение  $F_v/F_m$  соответствует потенциально возможной эффективности использования энергии света РЦ ФС 2 [1 – 3, 5, 6].

В используемом нами флуориметре мощность тестирующих импульсов света в пике составляла около 0,2 – 0,4 вт/м<sup>2</sup> при длительности около 10 мкс. Мощность импульсов засветки была не менее 3000 вт/м<sup>2</sup> при длительности около 300 мс.

Измерения  $F_0$  и  $F_m$  проводили в культурах микроводорослей и сгущенных с помощью воронки обратной фильтрации пробах фитопланктона в трех повторностях. Ошибка определений величины  $F_v/F_m$  не превышала 5 %.

Так как на свету активность реакционных центров снижается [1, 2], перед началом измерений флуоресцентных сигналов культуры микроводорослей и пробы фитопланктона выдерживали в темноте в течение 0,5 – 2 часов для того, чтобы все реакционные центры ФС2 перешли полностью в открытое состояние.

**Результаты и обсуждение.** Одной из основных функциональных характеристик фитопланктона является удельная скорость роста. Как известно, основными факторами среды, влияющими на скорость роста фитопланктона, являются свет, температура и биогенные вещества. Однако рост водорослей зависит не только от факторов среды, но и от таксономической принадлежности водорослей и объема их клеток. По нашим данным, для культур массовых видов черноморских диатомовых и динофитовых водорослей максимальная удельная скорость роста у диатомовых водорослей существенно выше, чем у динофитовых,

что обусловлено, очевидно, генотипическими различиями между этими группами водорослей (рис.1).

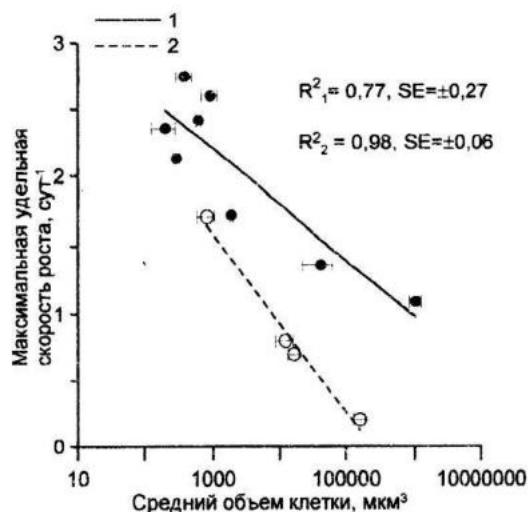


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста диатомовых (1) и динофитовых (2) водорослей от объема клеток (SE — стандартная ошибка определений)

Известно, что относительное содержание хлорофилла *a* в расчете на единицу органического углерода у диатомовых водорослей в 2-3 раза выше, чем у динофитовых [10]. По некоторым данным, интенсивность фотосинтеза у первой группы водорослей приблизительно в 1,5 раза выше, чем у второй [11]. Вероятно, поэтому во всем исследованном размерном диапазоне ( $10^2 - 10^6$  мкм<sup>3</sup>) наблюдаются достоверные различия между значениями удельной скорости роста этих двух групп водорослей. Следует отметить, что максимальная удельная скорость роста зависит также от объема клеток водорослей. Из полученных результатов следует, что при увеличении клеточного объема у диатомовых водорослей на четыре порядка удельная скорость роста снижается приблизительно в 2,5 раза. У динофитовых видов водорослей, увеличение объема клеток на два порядка вызывало снижение удельной скорости роста в 8,5 раза. Что касается относительной переменной флуоресценции хлорофилла, то она не зависит от размеров водорослей и их таксономической принадлежности [6].

Начиная исследования, мы исходили из предположения о том, что между удельной скоростью роста фитопланкто-

на и величиной  $F_v/F_m$  может существовать количественная связь.

На пяти видах диатомовых водорослей было получено, что при оптимальных интенсивностях света ( $140 - 160$  мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) в накопительных культурах удельная скорость роста связана с величиной относительной переменной флуоресценции линейной зависимостью с высоким коэффициентом детерминации, составившим 0,74 (рис.2 а). Максимальные значения обоих параметров получены в фазе экспоненциального роста культур. Минимальные величины наблюдались в стационарной фазе роста. Из рис. 2а следует, что при одном и том же значении относительной переменной флуоресценции удельная скорость роста различается в 2–5 раз.

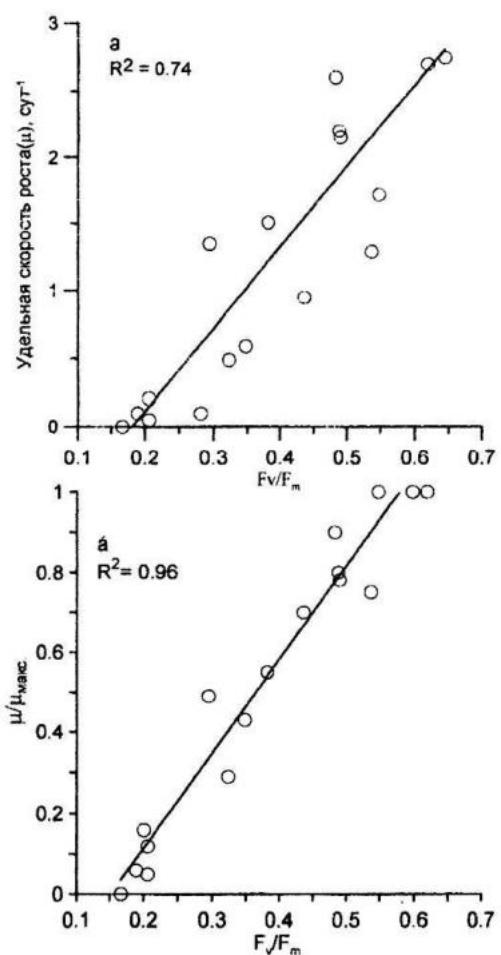


Рис. 2. Связь величины  $F_v/F_m$  с удельной скоростью роста (а) и удельной скоростью роста, нормированной на максимальную удельную скорость роста (б)

Это обусловлено тем, что в экспериментах использованы виды водорослей с различным объемом клеток, который, как отмечено выше, существенно влияет на удельную скорость роста. Поэтому для получения более тесной связи между  $F_v/F_m$  и удельной скоростью роста последняя была нормирована на максимальную удельную скорость роста каждого вида. В результате этого коэффициент детерминации для зависимости между относительной переменной флуоресценцией и удельной скоростью роста, нормированной на максимальную, составил 0,96 (рис. 2б). Видно, что при максимальных значениях величины  $\mu/\mu_{\max}$ , равных 1, относительная переменная флуоресценция достигала 0,60 – 0,65.

На трех видах диатомовых водорослей *S. costatum*, *C. curvisetus* и *D. brightwellii*, получено, что величина  $F_v/F_m$  связана линейной зависимостью с отношением между органическим углеродом и азотом (C/N) в клетках водорослей. Максимальная относительная переменная флуоресценция (0,55 – 0,60) наблюдалась, когда отношение C/N в клетках водорослей составляло 6 – 8. По мере увеличения последнего до 12 – 15 относительная переменная флуоресценция снижалась до 0,20 (рис. 3). Результаты, полученные ранее на двух видах водорослей: зеленой *Dunaliella tertiolecta* и диатомовой *Thalassiosira weissflogii* [6], совпадают с нашими данными. На этом основании можно заключить, что одним из основных факторов, регулирующих величину относительной переменной флуоресценции в водорослях, является содержание биогенных элементов в клетках.

Исследования в фитопланктоне показали, что в холодный период года (с января по апрель), когда интенсивность солнечной радиации составляла 4 – 12 Э·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup>, а температура воды 7 – 15 °С, удельная скорость роста изменялась от 0,17 до 0,99 сут<sup>-1</sup>, а в среднем составила 0,51 сут<sup>-1</sup>. Переменная флуоресценция ( $F_v/F_m$ ) изменялась от 0,17 до 0,54 при среднем значении 0,35 (табл. 1).

В теплое время года (с мая по август) интенсивность солнечной радиации возросла до 15 – 40 Э·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup>, а температура воды была в среднем на 10 градусов выше. Удельная скорость роста фитопланктона повысилась в среднем в 1,7 раза по сравнению с холодным периодом. Величина относительной переменной флуоресценции незначительно отличалась от ее значений, полученных в холодный период, и составила в среднем 0,39. Вероятно, этот показатель не зависит от температуры.

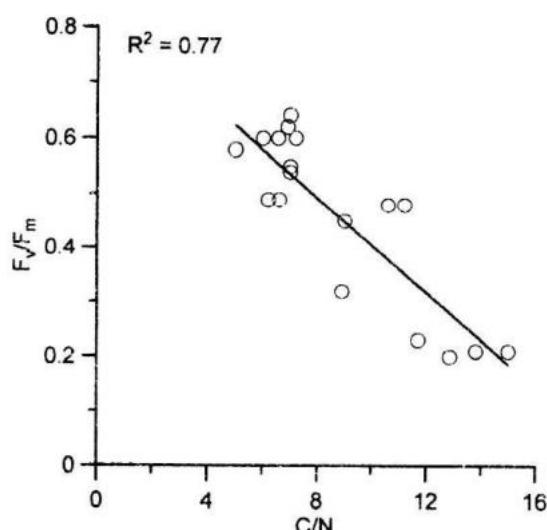


Рис. 3. Зависимость относительной переменной флуоресценции ( $F_v/F_m$ ) от отношения органического углерода к азоту (C/N) в культурах диатомовых водорослей

В исследованных водах как в холодное, так и в теплое время года концентрации основных биогенных веществ изменились в широких пределах. Минимальное содержание нитратов в холодное время года составило 0,1 мкМ, а в теплое время было на порядок ниже. Максимальная концентрация этого вещества в холодный и теплый периоды была практически одинакова (3,71 и 3,84 мкМ соответственно). Однако среднее содержание нитратов в холодное время года составило 1,28 мкМ, что приблизительно в 3 раза выше, чем в теплое. Концентрация аммония в холодный период изменилась от 0,18 до 1,62 мкМ, а в

Таблица 1

Удельная скорость роста фитопланктона ( $\mu$ ), относительная переменная флуоресценция ( $F_v/F_m$ ), биомасса динофитовых водорослей (Bdin.) и концентрация биогенных веществ в поверхностных водах Черного моря у Севастополя, в бухте Ласпи и у п. Кацивели в 2010 г.

Период	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$F_v/F_m$	Bdin., %	$NO_3$ , мкМ	$NH_4$ , мкМ	$PO_4$ , мкМ	Si, мкМ
Холодный	0,10-0,99	0,17-0,54	2-95	0,10-3,71	0,18-1,62	0,09-0,55	1,53-6,79
	0,51±0,27	0,35±0,13	43±31	1,28±1,26	0,71±0,45	0,27±0,14	2,76±1,28
Теплый	0,23-1,62	0,17-0,59	40-94	0,01-3,84	0,18-2,09	0,08-0,45	0,14-4,01
	0,87±0,38	0,39±0,11	72±17	0,45±0,80	1,04±0,58	0,20±0,10	1,67±0,94

среднем была равна 0,71 мкМ. В теплый период среднее содержание этого вещества было почти в 1,5 раза выше. Сопоставление концентраций нитратов и аммония в воде с установленными ранее константами полунасыщения для этих веществ [7] позволяет предположить, что при снижении содержания соединений азота в среде до величин менее 0,30 мкМ удельная скорость роста фитопланктона и относительная переменная флуоресценция будут ниже максимальных значений.

Концентрация фосфатов изменилась в холодное и теплое время года практически в одинаковых пределах, а среднее их содержание в холодный период составило 0,27 мкМ, в теплый – 0,20 мкМ. Эти концентрации существенно превышают известные константы полунасыщения, определенные по фосфору для фитопланктона Черного моря [12].

Концентрация минерального кремния в холодный период не снижалась ниже 1,53 мкМ, что приблизительно в 1,5 раза больше константы полунасыщения, определенной нами для прибрежных вод Черного моря ранее [7], а среднее его содержание составило 2,76 мкМ. В теплый период года концентрация этого вещества была в среднем в 1,6 раза ниже, что, вероятно, является одной из причин смены видового состава фитопланктона. В этот период на смену диатомовым водорослям, доминировавшим в планктоне в холодное время года, пришли динофитовые водоросли, для развития которых кремний не требуется.

Получена линейная связь между удельной скоростью роста водорослей и

величиной относительной переменной флуоресценции как для холодного, так и для теплого периодов года (рис. 4). Минимальные величины относительной переменной флуоресценции (0,15 – 0,20) в холодный и теплый периоды наблюдались, когда удельная скорость роста находилась в диапазоне от 0,10 до 0,30 сут<sup>-1</sup>. Значения  $F_v/F_m$  достигали максимума (0,55 – 0,60), когда удельная скорость роста повышалась до 0,96 – 0,99 сут<sup>-1</sup> в холодный период и до 1,40 – 1,43 сут<sup>-1</sup> в теплый. Вероятно, в этих условиях содержание биогенных веществ в во-

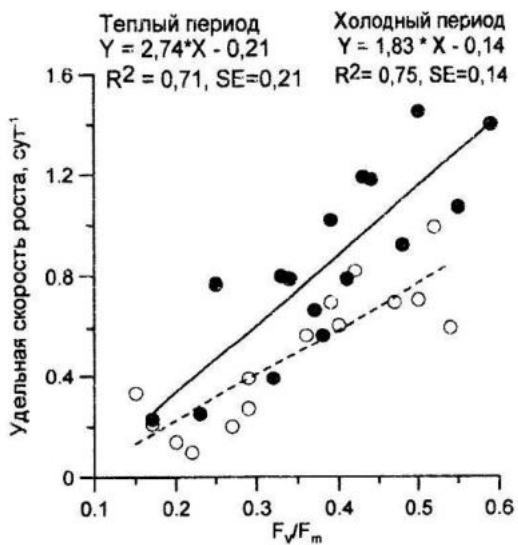


Рис. 4. Связь между удельной скоростью роста и относительной переменной флуоресценцией в теплый (сплошная линия) и холодный (пунктир) периоды года

достаточным для достижения максимальных значений удельной скорости роста и относительной переменной флуоресценции.

**Заключение.** Выявлена линейная связь между удельной скоростью роста и относительной переменной флуоресценцией ( $F_v/F_m$ ) для 5 черноморских видов диатомовых водорослей. При максимальных значениях удельной скорости роста величина  $F_v/F_m$  достигала 0,60 – 0,65. В исследованных культурах водорослей, когда внутриклеточное отношение C/N находилось в диапазоне от 6 до 8, значения  $F_v/F_m$  были максимальными и составляли 0,60 – 0,65. При увеличении отношения C/N до 12 – 15, они снижались в 3 раза.

Для холодного и теплого периодов года в исследованных водах выявлена линейная зависимость между удельной скоростью роста фитопланктона и относительной переменной флуоресценцией, что позволяет судить о величине удельной скорости роста фитопланктона и, следовательно, его функциональном состоянии по величине  $F_v/F_m$ .

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Конев Ю.Н., Каземирко Ю.В., Рубин А.Б. Использование двухвспышечного импульсного погружного флуориметра для определения фотосинтетической активности природного фитопланктона // Доклады Академии Наук, 1996. – 350, № 2. – С. 256 – 258.
2. Погосян С.И., Гальчук С.В., Каземирко Ю.В. Применение флуориметра “Мега-25” для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. – 2009. – № 6. – С. 34 – 40.
3. Corno G., Letelier R.M., Abbott M.R. Temporal and vertical variability in photosynthesis in the North Pacific Subtropical Gyre // Limnol. Oceanogr. – 2008. – 53. – P. 1252 – 1265.
4. Kolber Z., Falkowski P.G. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ // Limnol. Oceanogr. – 1993. – 38. – P. 1646 – 1665.
5. Kolber Z., Wyman K.D., Falkowski P.G. Natural variability in photosynthetic energy conversion efficiency: a field study in the Gulf of Maine // Limnol. Oceanogr. – 1990. – 35. – P. 72 – 79.
6. Berge J.A., Falkowski P.G. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: Induction of proteases in response to nitrogen or light limitation // Limnol. Oceanogr. – 1998. – 43. – P. 129 – 135.
7. Стельмах Л.В., Куфтаркова Е.А., Бабич И.И. Сезонная изменчивость скорости роста фитопланктона в прибрежных водах Черного моря (район Севастополя) // Морск. экол. журн. – 2009. – 8, № 1. – С. 67 – 80.
8. Methods of seawater analysis / ed. by K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling. – 2, rev. Ans extended ed. – Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie. – 1983. – 419 p.
9. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 119 с.
10. Стельмах Л.В., Бабич И.И. Сезонная изменчивость отношения органического углерода к хлорофиллу *a* и факторы, ее определяющие в фитопланктоне прибрежных вод Черного моря // Морск. экол. журн. – 2006. – 5, № 2. – С. 74 – 87.
11. Финенко З.З. Эколо-физиологические основы первичной продукции в море: автореф. дис. ... док. биол. наук. – Севастополь, 1976. – 46 с.
12. Пархоменко А.В. Поглощение фосфатов микропланктоном в эвфотической зоне Черного и Средиземного морей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 1988. – 17 с.