

УДК 582.261+577.95

Ж.В. МАРКИНА, Т.Ю. ОРЛОВА, Н.А. АЙЗДАЙЧЕР,
С.С. ВОЗНЕСЕНСКИЙ, А.Ю. ПОПИК, Е.Л. ГАМАЮНОВ

Оценка состояния фотосинтетического аппарата *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert, 2013 (Haptophyta) с помощью спектрофотометрии и лазерно-индуцированной флуоресценции

Исследовано состояние фотосинтетического аппарата гартофитовой водоросли Tisochrysis lutea на разных стадиях роста. Динамика содержания хлорофилла а и каротиноидов, показателей лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) описывалась, как и рост микроводоросли, s-образной кривой. Максимальные показатели содержания фотосинтетических пигментов и ЛИФ отмечены на стационарной фазе роста; минимальные – на экспоненциальной. Содержание в клетках хлорофилла а выражено увеличивалось на фазе гибели, каротиноидов – монотонно росло на всем протяжении эксперимента.

Ключевые слова: *Tisochrysis lutea*, фотосинтетический аппарат, фотосинтетические пигменты, лазерно-индуцированная флуоресценция, ультраструктура.

Evaluation of *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert, 2013 (Haptophyta) photosynthetic apparatus state by spectrophotometric and laser-induced fluorescence methods. Zh.V. MARKINA^{1,2}, T.Yu. ORLOVA¹, N.A. AIZDAICHER¹, S.S. VOZNESENSKIY^{2,3}, A.Yu. POPIK^{2,3}, E.L. GAMAYUNOV^{2,3}.¹National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok; ²Far Eastern Federal University, Vladivostok; ³Institute of Automation and Control Processes, FEB RAS, Vladivostok).

Photosynthetic state of haptophyte alga Tisochrysis lutea on different growth phases was studied. It was shown, that chlorophyll a and carotenoids content dynamic, laser-induced fluorescence (LIF) parameters has been described, as

*МАРКИНА Жанна Васильевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник (Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток; Дальневосточный федеральный университет, Владивосток); ОРЛОВА Татьяна Юрьевна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, АЙЗДАЙЧЕР Нина Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник (Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток); ВОЗНЕСЕНСКИЙ Сергей Серафимович – доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией, ПОПИК Александр Юрьевич – кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник, ГАМАЮНОВ Евгений Леонидович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток; Институт автоматки и процессов управления ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: zhannav@mail.ru

Работа поддержана грантом РФФ (соглашение № 14-50-00034) в части определения спектров лазерно-индуцированной флуоресценции микроводорослей, грантами ДВО РАН (программы: 0262-2015-0089 «Дальний Восток» – в части получения образцов микроводорослей и обработки результатов, 15-1-7-012 «Исследование микроводорослей пико- и нанопланктона для использования в качестве биоиндикаторов присутствия загрязняющих веществ в водной среде» – в части получения и поддержания культур микроводорослей), частично – грантом РФФИ № 16-34-00257 и выполнена с использованием оборудования ЦКП ЛАМИ (лазерных методов исследования) Института автоматки и процессов управления ДВО РАН.

Работа поддержана грантом ДВО РАН по программе «Дальний Восток» (№ 18-3-044) в части экспериментов с культурами микроводорослей и грантом ДВО РАН по программе «Дальний Восток» (№ 18-3-052) в части получения культур микроводорослей.

microalgae growth, like s-shaped curve. Maximum photosynthetic pigments content and LIF parameters registered on stationary growth phase and minimum – on exponential phase. Chlorophyll a content in cells markedly raised in phase of death, but carotenoids content monotonically increased on all experiment length.

*Key words: *Tisochrysis lutea*, photosynthetic apparatus, photosynthetic pigments, laser-induced fluorescence, ultrastructure.*

Одной из важнейших задач современной экологии является изучение действия факторов среды на одноклеточные водоросли. Наиболее часто для оценки функционирования фотосинтетического аппарата измеряют содержание фотосинтетических пигментов с помощью рутинного метода спектрофотометрии. Несмотря на его широкое применение, остается вопрос о необходимости разработки методики, позволяющей оценить функциональные изменения, происходящие в клетках микроводорослей *in situ*, т.е. непосредственно в среде обитания. Лазерно-индуцированная флуоресценция (ЛИФ) является одним из наиболее перспективных направлений контроля состояния растений и обнаружения их стрессового состояния [1, 3, 9, 12]. Высокая скорость, информативность и неинвазивность делают ЛИФ универсальным инструментом изучения фотосинтетического аппарата водорослей. Метод ЛИФ позволяет передавать возбуждающее излучение и получаемый сигнал по оптоволокну на необходимые расстояния, является удобным для применения в погружных системах, необходимых для осуществления *in situ* измерений в широком диапазоне глубин. В настоящее время весьма популярными являются методики оценки работы фотосинтетического аппарата такими методами флуорометрии, как, например, PAM, FRe, FRR, однако они не позволяют проводить измерения на больших глубинах. Также ЛИФ по измерениям спектров флуоресценции дает возможность предварительно оценить пигментный состав и эффективность работы фотосинтетического аппарата, а именно интенсивность флуоресценции фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) [1, 2, 6, 7].

Цель настоящей работы – оценка состояния фотосинтетического аппарата микроводоросли *Tisochrysis lutea* с помощью методов спектрофотометрии и лазерно-индуцированной флуоресценции, а также подтверждение возможности оценки фотосинтетической активности микроводорослей по измерениям спектров ЛИФ.

Материалы и методы

Объектом исследования служила одноклеточная водоросль *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert, 2013 (Haptophyta) из коллекции микроводорослей Ресурсного центра «Морской биобанк» Национального научного центра морской биологии ДВО РАН. Культура выделена из прибрежных вод зал. Восток (Японское море) с глубины 0,5 м Н.А. Айздайчер. Водоросль выращивали на среде *f* [13], приготовленной на основе стерилизованной морской воды [8] при температуре 20 °С, интенсивности освещения 70 мкмоль м⁻² с⁻¹ в области видимого света при свето-темновом периоде 12 ч свет : 12 ч темнота. В качестве посевного материала использовали культуру водорослей в экспоненциальной стадии роста.

Образцы для определения содержания хлорофилла *a* и каротиноидов и ЛИФ-исследования хлорофилла *a* отбирали на стадии экспоненциального роста (11 сут), в начале стационарной стадии (32 сут) и ее конце (75 сут).

Количество клеток водорослей подсчитывали в счетной камере Горяева под микроскопом Zeiss Primo Star.

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов установили стандартным методом экстракции из клеток ацетоном с последующим измерением на спектрофотометре Shimadzu-UV 2550. Концентрации рассчитывали по стандартным формулам [4].

Возбуждение ЛИФ осуществлялось непрерывным лазерным излучением с длиной волны 442 нм мощностью 38 мВт. Время воздействия лазерного излучения на пробу во

всех случаях составляло 2 с. Спектры ЛИФ фитопланктона измеряли на спектрометре Shamrock 303i (Andor Technology, США).

Все опыты проводили в трех повторностях. На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения. Коэффициент корреляции определялся для средних значений сравниваемых параметров, число измерений равно трем.

Результаты и обсуждение

Рост культуры *Tisochrysis lutea* описывается типичной s-образной кривой (рис. 1А), характерной для большинства видов одноклеточных водорослей [10].

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов изменялось подобно динамике численности клеток (рис. 1Б). К началу стационарной фазы роста содержание хлорофилла *a* и каротиноидов увеличивалось в 4 и 5 раз соответственно по сравнению с таковым в экспоненциальной фазе роста. К 75-м суткам культивирования концентрации фотосинтетических

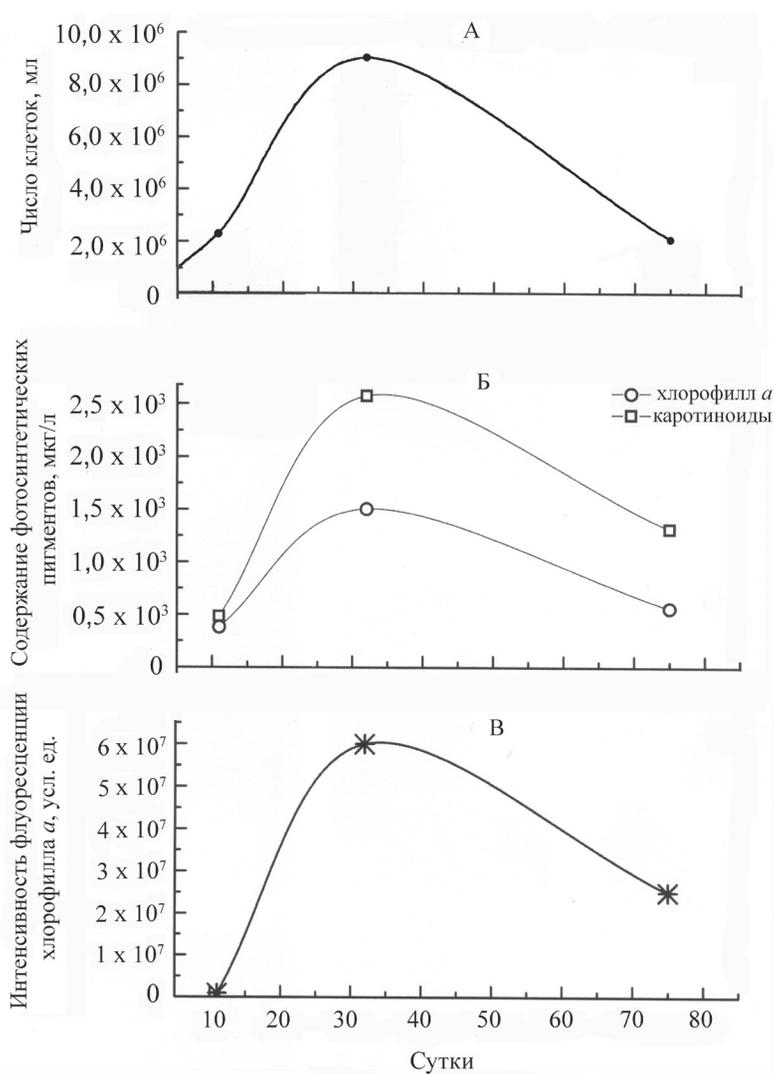


Рис. 1. Рост и содержание фотосинтетических пигментов *Tisochrysis lutea*: А – численность клеток; Б – содержание хлорофилла *a* и каротиноидов *Tisochrysis lutea*; В – интенсивность флуоресценции хлорофилла *a*

пигментов понижались. Процент феофитина от общего хлорофилла *a* составлял: $10,0 \pm 2,3$ % (11 сут), $20,3 \pm 5,9$ (32), $26,8 \pm 6,5$ % (75 сут).

Такая же картина наблюдалась в изменении интенсивности ЛИФ основного пика флуоресценции хлорофилла *a* (рис. 1*B*).

Полученные данные согласуются с результатами опытов на культуре *Thalassiosira weissflogii*, в которых на экспоненциальной фазе рост популяции сопровождался одновременным пропорциональным увеличением содержания хлорофилла *a*, каротиноидов и интенсивности флуоресценции хлорофилла [5]. Уменьшение интенсивности флуоресценции на поздней стационарной фазе (75 сут), по-видимому, не только зависело от содержания хлорофилла *a*, но и было связано с деформацией тилакоидов, что ранее наблюдалось на диатомовой водоросли [11].

Спектры ЛИФ суспензий *T. lutea* имели стандартную форму, характерную для спектров флуоресценции микроводорослей фитопланктона. В спектрах определялись 3 пика: комбинационного рассеяния воды (525 нм) и два – ЛИФ хлорофилла *a* (первый соответствовал флуоресценции фотосистемы II и находился на длине волны 685 нм, второй соответствовал фотосистеме I и находился на длине волны 740 нм). Соотношение между интенсивностями флуоресценции пиков хлорофилла *a* на протяжении всего эксперимента было примерно 0,2. Максимальной спектральной плотностью сигнала, как и максимальной интегральной интенсивностью флуоресценции, обладала фотосистема II. Поиск пиков осуществлялся автоматически после фильтрации спектров при помощи фильтра Савицкого–Голая, который осуществлял полиномиальную аппроксимацию отдельных кадров входного сигнала по критерию минимума квадратичной ошибки. Степень полинома II, количество точек в окне фильтрации – 20. Минимальный порог высоты при определении пика – 20 %.

Спектральная плотность интенсивности ЛИФ на длине волны пика флуоресценции фотосистемы II на 11-е сутки была равна $0,086 \times 10^7$ усл. ед., на 32-е – $6,11 \times 10^7$, на 75-е – $2,37 \times 10^7$ усл. ед. Таким образом, мы наблюдали изменение интенсивности ЛИФ по мере роста культуры, которое соответствовало изменению количества клеток и пигментов. Коэффициент корреляции между изменением количества клеток и интенсивностью ЛИФ равен 0,9, между количеством хлорофилла и интенсивностью его ЛИФ – 0,96. Сильного изменения формы спектральной картины по мере роста культуры не замечено. Отношение интенсивности ЛИФ ФС I/ФС II на 11-е сутки было равно 0,21, на 32-е и 75-е сутки – 0,17.

Вследствие изменения числа клеток в процессе культивирования изменялись общее содержание пигментов в культуре и, в итоге, интенсивность флуоресценции хлорофилла *a*. Таким образом, по данным каждого метода сложно сделать определенные выводы о состоянии фотосинтетического аппарата водоросли. В связи с этим мы оценили его работу на основе комбинирования данных, полученных методом подсчета числа клеток, спектрофотометрического определения содержания фотосинтетических пигментов и ЛИФ. Известно, что интенсивность флуоресценции зависит напрямую от концентрации хлорофилла *a* в культуре и косвенно – от концентрации каротиноидов, так как они являются источником дополнительной энергии для хлорофилла. Как показали наши расчеты, зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* от количества пигментов в культуре по мере ее роста нелинейна и определяется фазой роста (рис. 2*A*). Так, интенсивность флуоресценции отмирающей культуры, в которой уменьшается не только число клеток, но и количество фотосинтетических пигментов, на 25 % выше, чем флуоресценция такого же количества пигментов в растущей популяции.

Хлорофилл *a* в отмирающих микроводорослях имел флуоресцентное свечение в 2,5 раза большее, чем во время активного роста культуры (рис. 2*B*). Напротив, интенсивность флуоресценции линейно зависит от концентрации каротиноидов в культуре, при этом фаза роста не оказывает влияния на эту зависимость (рис. 2*B*). Концентрация хлорофилла *a* на 1 кл. на экспоненциальной и ранней стационарной фазах увеличивалась крайне незначительно (рис. 3) и заметно увеличивалась при отмирании культуры, несмотря на

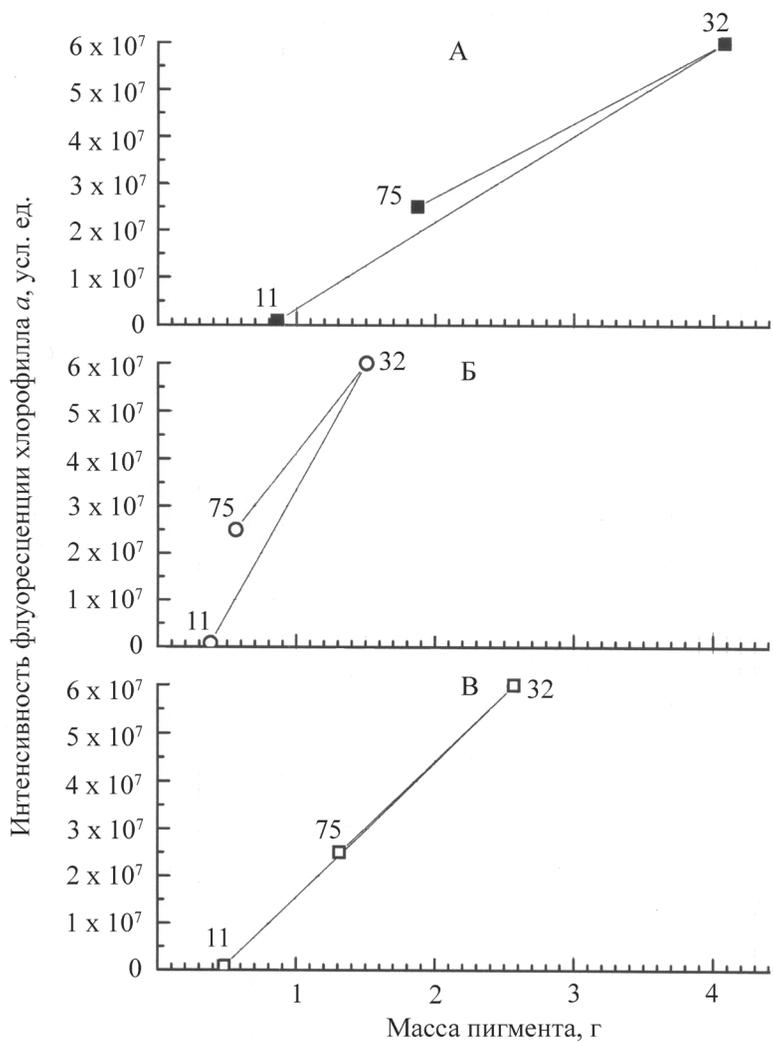


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* у *Tisochrysis lutea* относительно концентрации фотосинтетических пигментов в культуре. А – хлорофилл и каротиноиды; Б – хлорофилл; В – каротиноиды. Цифрами указаны сутки культивирования

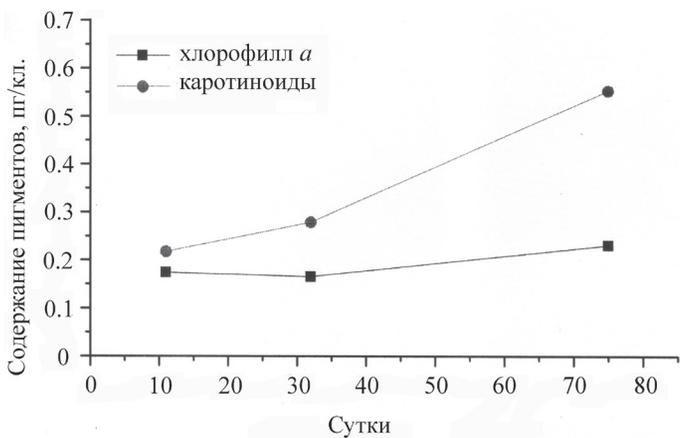


Рис. 3. Содержание фотосинтетических пигментов *Tisochrysis lutea* на 1 кл.

уменьшение общего числа клеток в культуре и общего числа фотосинтетических пигментов. Концентрация каротиноидов в клетках по мере роста культуры постепенно увеличивалась, при этом их содержание в клетках отмирающей культуры в 2–3 раза выше, чем в клетках растущей. Кроме того, данные рис. 3 позволяют объяснить причину увеличения флуоресценции при уменьшении числа клеток. Это связано с тем, что пигмента в отмирающих клетках больше, чем в растущих, и флуоресценция в отмирающих клетках зависит не столько от содержания хлорофилла *a* во всей культуре, сколько от его концентрации в клетке. Однако остается неясным, приводит ли увеличение концентрации хлорофилла *a* в клетке к снижению эффективности передачи энергии в цепь фотосинтеза либо, наоборот, накопление пигмента вызвано снижением этой эффективности.

Для эффективной интерпретации результатов были проанализированы данные, полученные всеми использованными в работе методами. В результате состояние культуры предложено оценивать по количеству пигментов, необходимому для создания одной условной единицы флуоресценции хлорофилла *a* (1 Мфлур = 10^6 флур, или 10^6 усл. ед. флуоресценции). Данный параметр позволяет оценить работу фотосинтетического аппарата при заданном уровне флуоресценции: если пигментов мало – фотосинтетическая активность низкая, если много – высокая. Эту характеристику можно назвать «пигментной эффективностью», необходимо также различать эффективность хлорофилла *a* и общую пигментную эффективность (рис. 4). Так, культура, находящаяся на пике своего развития, и отмирающая культура имеют очень низкую пигментную эффективность, следовательно, интенсивность передачи поглощенной энергии в цепочку фотосинтеза тоже уменьшается. При этом 11-дневная культура имеет относительно высокую пигментную эффективность, что говорит о хорошо идущем фотосинтезе.

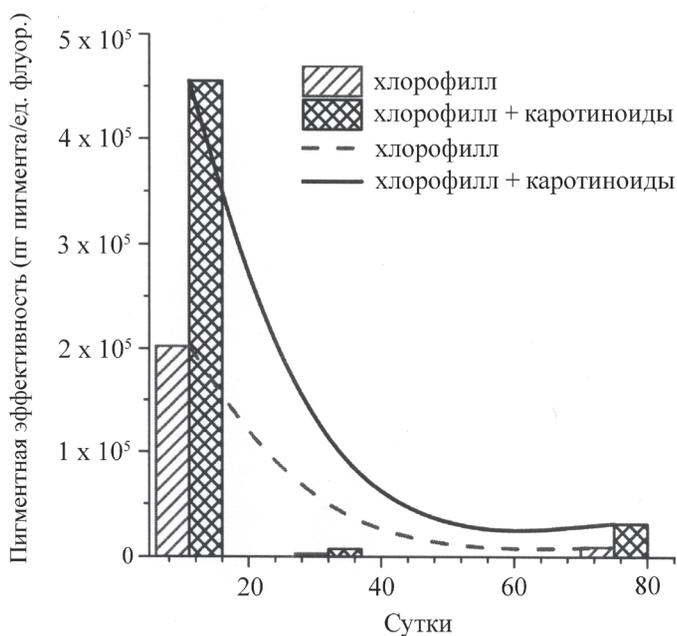


Рис. 4. Изменение пигментной эффективности клеток *Tisochrysis lutea*

Таким образом, комплексный анализ данных, полученных в результате использования трех представленных методов (количественного учета клеток, спектрофотометрического определения концентрации хлорофилла *a* и показателей ЛИФ), дает возможность оценить физиологическое состояние клеток в популяции. Дальнейшее развитие комплексного анализа даст ответ, как концентрация пигмента в клетке отражается на спектре флуоресценции, что позволит оценивать возраст и состояние культуры *in situ*

при помощи оптической измерительной техники, без предварительных заборов проб и рутинных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вознесенский С.С., Попик А.Ю., Гамаюнов Е.Л., Орлова Т.Ю., Маркина Ж.В. Влияние температуры среды на спектры лазерно-индуцированной флуоресценции микроводорослей // Вестн. ДВО РАН. 2015. № 3. С. 30–35.
2. Вознесенский С.С., Гамаюнов Е.Л., Попик А.Ю., Коротенко А.А. Оптоволоконный флуориметр для измерения параметров фотосинтеза фитопланктона // Приборы и техника эксперимента. 2014. № 3. С. 97–103.
3. Гамаюнов Е.Л., Попик А.Ю. Зависимость флуоресценции фитопланктона от внешних воздействий // Биофизика. 2015. Т. 60, № 1. С. 143–151.
4. ГОСТ 17.1.4.02–90. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла *a* / Гос. стандарт СССР; Гос. ком. СССР по охране природы. М.: Изд-во стандартов, 1990. 15 с.
5. Конохов И.В. Изменение параметров флуоресценции диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* в процессе роста при разных условиях облучения и минерального питания: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2009. 20 с.
6. Кульчин Ю.Н., Букин О.А., Константинов О.Г., Вознесенский С.С., Павлов А.Н., Гамаюнов Е.Л., Майор А.Ю., Столярчук С.Ю., Коротенко А.А., Попик А.Ю. Комплексный контроль состояния морских акваторий оптическими методами. Ч. 1. Концепция построения многоуровневых измерительных систем для экологического мониторинга прибрежных акваторий // Оптика атмосферы и океана. 2012. Т. 25, № 7. С. 633–637.
7. Кульчин Ю.Н., Вознесенский С.С., Гамаюнов Е.Л., Коротенко А.А., Попик А.Ю., Майор А.Ю. Комплексный контроль состояния морских акваторий оптическими методами. Ч. 4. Оптоволоконная система измерения концентрации фитопланктона // Оптика атмосферы и океана. 2013. Т. 26, № 1. С. 40–45.
8. Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А., Стоник И.В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов: науч.-метод. пособие. Владивосток: Дальнаука, 2011. 89 с.
9. Попик А.Ю., Гамаюнов Е.Л. Исследование зависимости интенсивности флуоресценции фитопланктона от параметров среды // Электрон. средства и системы управления. 2014. № 2. С. 186–190.
10. Fogg G.E. Algal cultures and phytoplankton ecology. Madison: Univ. of Wisconsin Press, 1966. 126 p.
11. Garcia N., López-Eliás J.A., Miranda A. et al. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases // Lat. Am. J. Aquat. Res. 2012. Vol. 40, N 2. P. 435–440.
12. Gopal R., Mishra K.B., Zeeshan M. et al. Laser induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress // Current Science. 2002. Vol. 83, iss. 7. P. 880–884.
13. Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // Can. J. Microbiol. 1962. Vol. 8. P. 229–239.