

## ЗАВИСИМОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИТОПЛАНКТОНА ОТ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

© 2015 г. Е.Л. Гамаюнов, А.Ю. Попик

*Институт автоматизируемой и процессов управления ДВО РАН, 690041, Владивосток, ул. Радио, 5*

*E-mail: gamayunov@iacp.dvo.ru*

Поступила в редакцию 21.10.14 г.

Являясь основным источником кислорода и первичным звеном пищевой цепочки водных объектов, фитопланктон играет важную роль в их экологическом состоянии. При определении концентрации флуоресцентным методом не учитывают влияние на интенсивность флуоресценции параметров среды. В статье теоретически и экспериментально доказывается зависимость между флуоресценцией хлорофилла *a* в составе клеток фитопланктона и температурой воды и освещенностью. Предложена формула для расчета коэффициента пропорциональности, который позволяет определить концентрацию хлорофилла *a* с учетом параметров среды. Использование данного коэффициента позволяет снизить ошибку определения концентрации хлорофилла *a* флуоресцентным методом. Показано распределение концентрации фитопланктона по глубине, рассчитанное с использованием классической методики и предложенного в статье коэффициента. Флуоресценцию фитопланктона измеряли с помощью оптоволоконного спектрометра в акватории залива Петра Великого в сентябре–октябре 2013 года.

*Ключевые слова: концентрация фитопланктона, флуоресценция, экологический мониторинг.*

Микроводоросли фитопланктона являются главным поставщиком кислорода в масштабах всей планеты и первичным звеном в пищевой цепочке любого водоема. Изменение физико-химических параметров среды обитания фитопланктона приводит к изменениям состояния клеток микроводорослей и последующей гибели или, наоборот, к стремительному размножению их отдельных видов. Благополучное состояние водоема характеризуется преобладанием автотрофных водорослей, выделяющих в процессе фотосинтеза кислород, над гетеротрофными, потребляющими кислород. Количественный и видовой состав фитопланктона зависит от условий окружающей среды, и поэтому его удобно использовать для оценки и прогноза экологического состояния водных акваторий. Основанные на таком представлении методы анализа экологического состояния получили название клеточный биомониторинг [1].

Измерение концентрации клеток фитопланктона и параметров фотосинтеза в них наиболее часто выполняется методами флуориметрии и флуоресцентной спектроскопии. В основе этих методов лежит измерение спектра флуоресцентного излучения клеток микроводорослей, вызванного внешним естественным или искусственным воздействием. Спектр флуоресценции определяется составом пигментов в клетке микроводоросли, а также внешними ус-

ловиями среды, которые влияют на протекающие в ней биохимические реакции. Наиболее чувствительными к внешним условиям являются реакции фотосинтеза с участием хлорофилла *a* – характеристического пигмента, содержащегося в хлоропластах зеленых автотрофных клеток. Многие исследователи отмечают зависимость функционального состояния фотосинтетического аппарата от различных факторов, среди которых наиболее значимыми являются внешние условия среды обитания: температура [2–4], освещенность [5–8], интенсивность ультрафиолетового излучения [9–11], наличие питательных веществ и гербицидов [12,13]. Значения указанных параметров среды зависят от глубины. Например, в работе [14] авторы отмечают, что эффективность фотосинтеза уменьшается с глубиной, и связывают это с уменьшением освещенности, интенсивности ультрафиолетового излучения, температуры и доступности питательных веществ. Снижение эффективности фотосинтеза связано с закрытием реакционных центров клетки микроводоросли, что приводит к замедлению фотохимических реакций синтеза органических веществ и увеличению флуоресцентного излучения. Таким образом, интенсивность флуоресценции хлорофилла *a*, находящегося в составе клеток фитопланктона, определяется не только его общей концентрацией в воде, но и состоянием клеток фитопланктона,

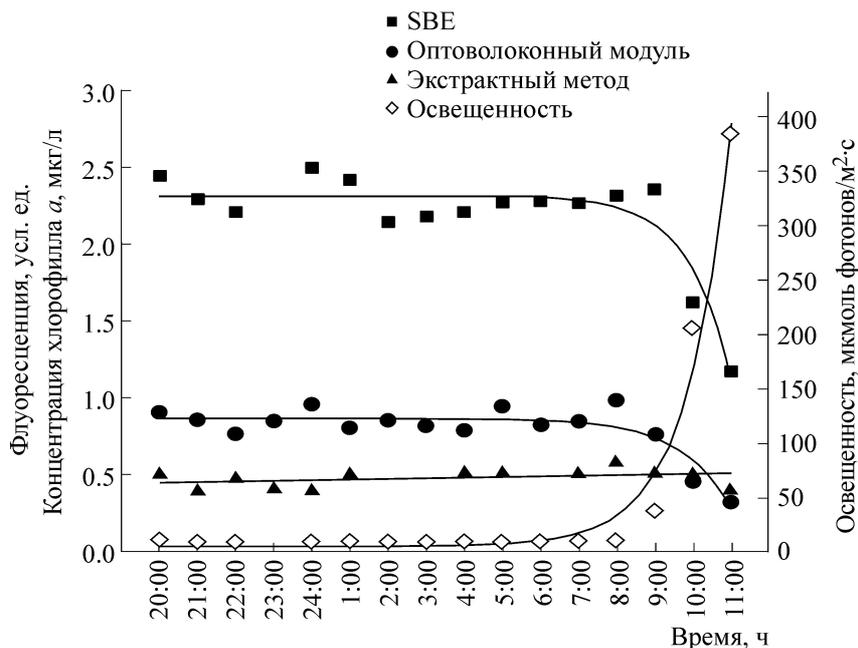


Рис. 1. Результаты измерений флуоресценции и концентрации хлорофилла *a* на глубине 4 м.

которое, в свою очередь, зависит от таких параметров внешней среды, как освещенность и температура. Существующие методики расчета концентрации хлорофилла *a*, основанные на измерении интенсивности флуоресценции, не учитывают влияние внешних условий на состояние клеток фитопланктона, что обуславливает большую погрешность таких расчетов.

Большинство методик анализа состояния фитопланктона предполагают вычисление концентрации хлорофилла *a* по величине измеренной интенсивности флуоресценции в диапазоне длин волн 680–690 нм. Анализ выполненных в ряде экспедиций измерений концентрации хлорофилла *a* флуоресцентным методом [2] и методом экстрактивного определения фотосинтетических пигментов [3] показал, что наблюдается различие между значениями концентрации, определяемыми разными методами. При выполнении суточных станций в морских акваториях залива Петра Великого в Приморском крае авторами статьи было замечено, что интенсивность флуоресценции, регистрируемая погружаемыми датчиками, изменяется с течением времени даже в тех случаях, когда концентрация фитопланктона, а значит, и концентрация хлорофилла *a* существенно не меняются.

На рис. 1 представлены результаты измерений флуоресценции и концентрации хлорофилла *a*, выполненные во время одной из суточных станций в сентябре 2013 г. Измерения проводились на глубине 4 метра с 20:00 до

11:00 включительно с интервалом в 1 ч. Флуоресцентные измерения выполнялись погружаемым зондом SBE 16plus фирмы Sea-Bird Electronics с установленным датчиком флуоресценции WET Star фирмы WET Labs [15] и с помощью оптоволоконной измерительной системы, разработанной в Институте автоматики и процессов управления ДВО РАН [16]. Концентрацию хлорофилла *a* определяли экстрактивным методом во взятых с глубины 4 м пробах воды. Результаты измерений, полученные при помощи зонда SBE и измерительной системы собственной разработки, аппроксимировали экспонентной функцией. Вычисленный коэффициент корреляции для данных зонда SBE равен 0,85, а для данных измерительной системы собственной разработки – 0,8. Измеренные значения концентрации хлорофилла *a*, полученные в результате нефлуоресцентных измерений, аппроксимировали линейной функцией. При этом данные, полученные в результате флуоресцентных измерений обоими приборами, хорошо коррелируют между собой с коэффициентом корреляции 0,92. На графике зависимости интенсивности флуоресценции наблюдается ее резкое уменьшение после 8–9 ч, когда солнце достаточно высоко поднимается над горизонтом, что не наблюдается на графике изменения концентрации хлорофилла *a*, определенной экстрактивным методом. Считая, что концентрация фитопланктона на указанной глубине в течение суток не изменялась, можно предположить, что изменение интенсивности флуоресценции связа-

но с изменением внешних условий, оказывающих влияние на состояние клеток фитопланктона. Корреляционный анализ изменения параметров среды, измеряемых датчиками зонда SBE, позволил предположить сильную связь интенсивности флуоресценции с освещенностью, график изменения которой также приведен на рис. 1.

На глубинах более 15 м наблюдалось резкое снижение температуры и одновременно значительный рост интенсивности флуоресценции. Можно предположить, что увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* в термоклине связано не только с увеличением его концентрации, но и с уменьшением эффекта теплового тушения. Графики изменения флуоресценции и температуры с глубиной приведены на рис. 2. Вычисленный коэффициент корреляции между температурой и флуоресценцией в диапазоне глубин 15–20 м, который выделен на рисунке пунктирной линией, составляет –0,98, что позволяет предположить наличие линейной зависимости между этими параметрами.

Традиционно, при определении концентрации хлорофилла *a* флуоресцентным методом предполагают линейную зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации хлорофилла, и расчет выполняют по формуле [27]:

$$C = KF, \quad (1)$$

где  $C$  – концентрация хлорофилла *a*;  $K$  – коэффициент пропорциональности, определяемый конструкцией измерительного прибора;  $F$  – измеренная интенсивность флуоресценции.

В ряде работ [28–30] указывается, что коэффициент пропорциональности  $K$  имеет разные значения в зависимости от вида микроводорослей, присутствующих в исследуемой пробе воды. Наблюдаемая зависимость интенсивности флуоресценции от параметров среды позволяет предположить наличие функциональной зависимости коэффициента  $K$  также от освещенности и температуры. Предполагая их влияние независимым, коэффициента  $K$  может быть представлен функцией вида:

$$K = s_0 s_1(Q) s_2(T), \quad (2)$$

где  $s$  – коэффициент пропорциональности, зависящий от конструкции измерителя и вида фитопланктона;  $s_1(Q)$  – функция, зависящая от освещенности;  $s_2(T)$  – функция, зависящая от температуры.

Коэффициент  $K$  можно интерпретировать как функцию, характеризующую эффективность флуоресценции клетки микроводоросли. Чем

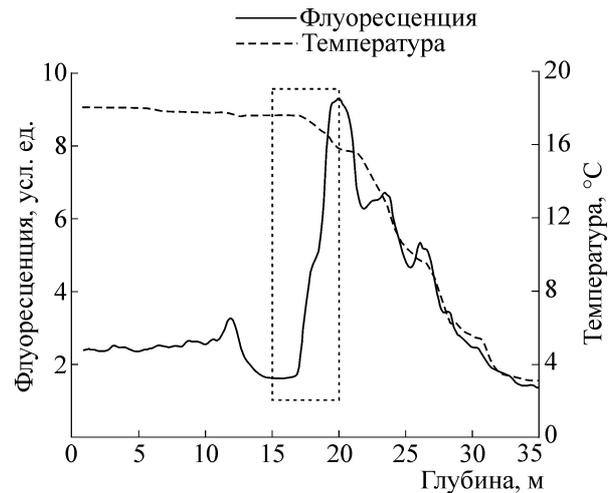


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* и температуры воды в зависимости от глубины (сентябрь 2013).

больше численное значение  $K$ , тем меньше интенсивность флуоресценции клетки.

В настоящей статье сделана попытка выявить влияние, которое оказывают освещенность и температура среды на интенсивность флуоресценции хлорофилла *a*, находящегося в составе клеток микроводорослей, а также выразить коэффициент пропорциональности  $K$  в виде функции от температуры и освещенности. Для выявления зависимости интенсивности флуоресценции от освещенности и температуры был выполнен цикл экспериментов с культурой микроводоросли *Isochrysis galbana*, любезно предоставленной лабораторией шельфовых сообществ Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОСВЕЩЕННОСТИ

В природных водоемах параметром, подвергающимся наибольшему изменению в течение суток или с глубиной, является освещенность. В течение суток освещенность меняется в зависимости от высоты солнца над горизонтом и состояния атмосферы. С увеличением глубины освещенность уменьшается практически до нуля на большой глубине [24], что связано с поглощением света в воде.

В ряде статей [5, 19–22] отмечается, что увеличение освещенности приводит к снижению флуоресценции клеток фитопланктона, во-первых, в связи с увеличением энергии, расходуемой в клетках на фотосинтез, что в результате вызывает фотохимическое тушение [19, 20], во-вторых, происходит изменение структуры хло-

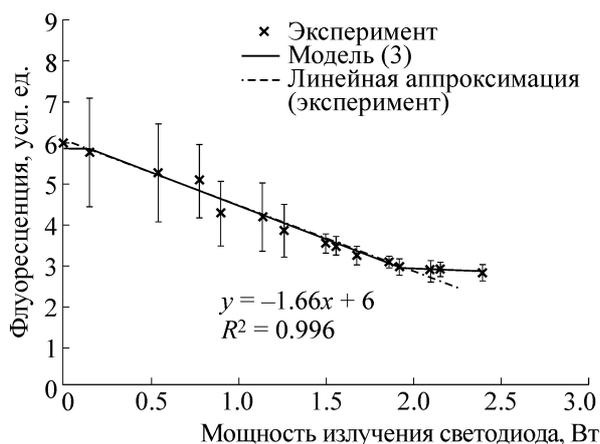


Рис. 3. Зависимость флуоресценции хлорофилла  $a$  от освещенности для культуры микроводоросли *Isochrysis galbana*.

ропластов, содержащих хлорофилл [21–23]. В работах [5,17] также показано, что при достижении критических значений освещенности флуоресценция достигает максимального или минимального уровня, и дальнейшее увеличение или уменьшение интенсивности освещения не приводит соответственно к дальнейшему увеличению или уменьшению флуоресценции.

### ЭКСПЕРИМЕНТ С ОСВЕЩЕННОСТЬЮ

Колба с культурой микроводоросли *Isochrysis galbana* была помещена в темную камеру, где происходила адаптация к темноте в течение 30 мин. Затем в камере включали источник света, в качестве которого использовали белый светодиод. Важным преимуществом такого источника света явилась малая рассеиваемая мощность, что позволило не применять специальные меры для охлаждения камеры. Интенсивность освещенности изменяли регулировкой протекающего через светодиод тока. При токе 700 мА измеренная мощность оптического излучения составила 1,8 Вт.

Интенсивность флуоресценции хлорофилла  $a$  определяли из общего спектра флуоресценции воды, содержащей фитопланктон. Обработку спектров осуществляли по методике, описанной в работах [5,6]. Полученные экспериментальные значения флуоресценции для культуры микроводоросли *Isochrysis galbana* показаны на рис. 3. Данные хорошо аппроксимируются линейным уравнением, которое приведено в поле графика. Вычисленный коэффициент корреляции для экспериментальных данных и аппроксимирующей прямой подтверждает высокую степень их близости.

Обращает на себя внимание наличие двух участков насыщения флуоресценции: при малой и при большой освещенности, что подтверждают выводы, сделанные в работах [5,17]. С учетом этих нелинейных эффектов насыщения флуоресценции, зависимость флуоресценции  $f$  от освещенности  $Q$  можно представить в виде следующей системы уравнений:

$$f(Q) = \begin{cases} f_{\max}, & \text{при } Q \leq Q_1 \\ (f_{\max} + k(Q - Q_1)), & \text{при } Q_1 < Q < Q_2 \\ f_{\min}, & \text{при } Q_2 \leq Q, \end{cases} \quad (3)$$

где  $Q_1$  – значение уровня освещенности, ниже которого интенсивность флуоресценции стабилизируется на максимальном уровне  $f_{\max}$ ;  $Q_2$  – значение уровня освещенности, выше которого интенсивность флуоресценции стабилизируется на минимальном уровне  $f_{\min}$ ;  $k$  – коэффициент пропорциональности, который для линейного участка графика может быть рассчитан по формуле:

$$k = \frac{f_{\max} - f_{\min}}{Q_1 - Q_2} = \frac{\Delta f}{\Delta Q}. \quad (4)$$

Представление коэффициента  $k$  в виде выражения (4) позволяет его интерпретировать как скорость изменения флуоресценции от уровня освещенности. Определение коэффициента  $k$  может быть легко выполнено путем последовательного измерения уровня флуоресценции в пробе выделенной культуры микроводорослей при различных уровнях внешнего освещения, для каждого вида фитопланктона. Этот коэффициент может быть использован в дальнейшем для выявления видового состава микроводорослей в пробах воды. В зависимости от вида фитопланктона значения критической освещенности  $Q_1$  и  $Q_2$ , как и интенсивность флуоресценции  $f_{\max}$  и  $f_{\min}$ , при этих измерениях будут разными для различных видов микроводорослей.

Согласно приведенному на рис. 3 уравнению коэффициент  $k = -1,66$ . Также на графике отчетливо видны участки насыщения, которые позволяют определить значения параметров:  $f_{\max} = 5,8$  отн. ед.,  $f_{\min} = 2,7$  отн. ед.,  $Q_1 = 0,15$  Вт,  $Q_2 = 1,9$  Вт. На этом же рисунке утолщенная линия построена по уравнению (3) с учетом найденных параметров. Вычисленный коэффициент корреляции для экспериментальных данных и модельной линии равен 0,996, что подтверждает высокую степень их соответствия.

Определим функцию  $s_1(Q)$  в выражении (2) как коэффициент связи между максимально воз-

можным (в темноте) значением флуоресценции и наблюдаемым, т. е.:

$$s_1(Q) = \frac{f_{\max}}{f(Q)}. \quad (5)$$

Подставив уравнение (3) в формулу (5), получим выражение для  $s_1(Q)$  в виде кусочно-линейной функции (6):

$$s_1(Q) = \begin{cases} 1, & \text{при } Q \leq Q_1 \\ f_{\max}/(f_{\max} + k(Q - Q_1)), & \text{при } Q_1 < Q < Q_2 \\ f_{\max}/f_{\min}, & \text{при } Q_2 \leq Q. \end{cases} \quad (6)$$

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ

Согласно источникам [3,4], основным воздействием температуры на хлорофилл  $a$  является нефотохимическое тушение флуоресценции. Возникновение температурного тушения флуоресценции обусловлено повышением частоты процессов столкновения молекул, что сопровождается дезактивацией возбужденных уровней путем безизлучательной колебательной релаксации молекул и понижением квантового выхода флуоресценции. Увеличение температуры должно приводить к уменьшению интенсивности флуоресценции хлорофилла  $a$  и, следовательно, должно учитываться при вычислении концентрации хлорофилла  $a$  в тех случаях, когда температура воды изменяется в течение суток или при измерениях вертикального профиля распределения фитопланктона.

В немногочисленных исследованиях показано, что интенсивность флуоресценции экспоненциально спадает при постепенном увеличении температуры. Подтверждающие экспериментальные результаты, полученные при исследовании флуоресценции хлорофилла, приводятся в статье [8] и в [9] для других веществ. Полученные данные хорошо аппроксимируются экспоненциальной функцией, что позволяет записать зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла  $a$  от температуры –  $\varphi(T)$  в следующем виде:

$$\varphi(T) = f_0 e^{-aT}, \quad (7)$$

где  $f_0$  – максимальная интенсивность флуоресценции в отсутствие температурного тушения;  $a$  – температурный коэффициент флуоресценции;  $T$  – температура среды.

Если функцию  $s_2(T)$  в выражении (2) определить как коэффициент связи между максимально возможным (в отсутствие температур-

ного тушения) значением флуоресценции и наблюдаемым, то:

$$s_2(T) = \frac{f_0}{\varphi(T)}. \quad (8)$$

Подставив выражение (7) в (8), получим следующее выражение для  $s_2(T)$ :

$$s_2(T) = e^{(aT)}. \quad (9)$$

### ЭКСПЕРИМЕНТ С ТЕМПЕРАТУРОЙ

Для подтверждения влияния температуры на флуоресценцию хлорофилла  $a$  был выполнен следующий лабораторный эксперимент. Колба с водой, содержащей культуру микроводоросли *Isochrysis galbana*, была охлаждена до температуры 2°C, после чего ее поместили в темную камеру, в которой она постепенно нагревалась до 20°C. Для равномерного нагрева колбу с культурой помещали в емкость с водой, перемешиваемой при нагреве. При нагреве на каждые 5°C измеряли флуоресценцию фитопланктона на длине волны 680 нм. Спектры флуоресценции воды регистрировали спектрометром Andor и обрабатывали по методике, описанной в работе [5,6].

На рис. 4 показаны результаты выполненных измерений, которые убедительно подтверждают наличие зависимости интенсивности флуоресценции хлорофилла  $a$  от температуры для трех проб с разной концентрацией клеток.

Как видно из рис. 4, зависимость флуоресценции от температуры хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией (7). На рисунке указаны уравнения экспонент, а также коэффициенты корреляции между функцией аппроксимации и экспериментальными данными для каждой концентрации. Коэффициент температурной чувствительности для *Isochrysis galbana*  $a = 0,028 \pm 0,008$ .

Эксперимент наглядно показывает, что по результатам измерения интенсивности флуоресценции хлорофилла  $a$  правильное определение концентрации возможно только в тех случаях, когда температура среды не изменяется, в противном случае возникает ошибка. Например, на рис. 4 видно, что флуоресценция при температуре 17°C для образца культуры с концентрацией  $10^6$  клеток/мл (верхняя кривая) мало отличается от флуоресценции при температуре 3°C для образца с концентрацией  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл (средняя кривая). В свою очередь, флуоресценция при 17°C для образца с концентрацией  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл мало отличается от флуо-

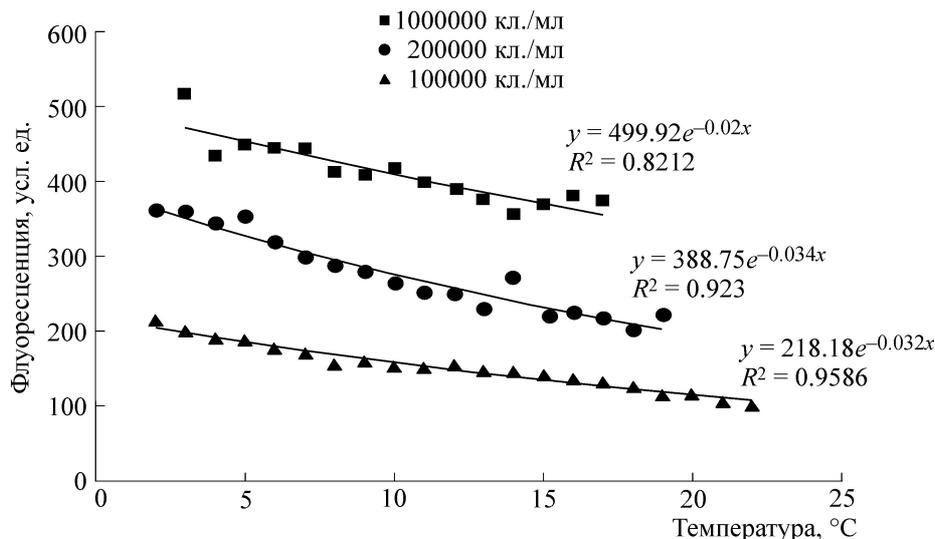


Рис. 4. Зависимость флуоресценции хлорофилла *a* от температуры, измеренная для водорослей *Isochrysis galbana*.

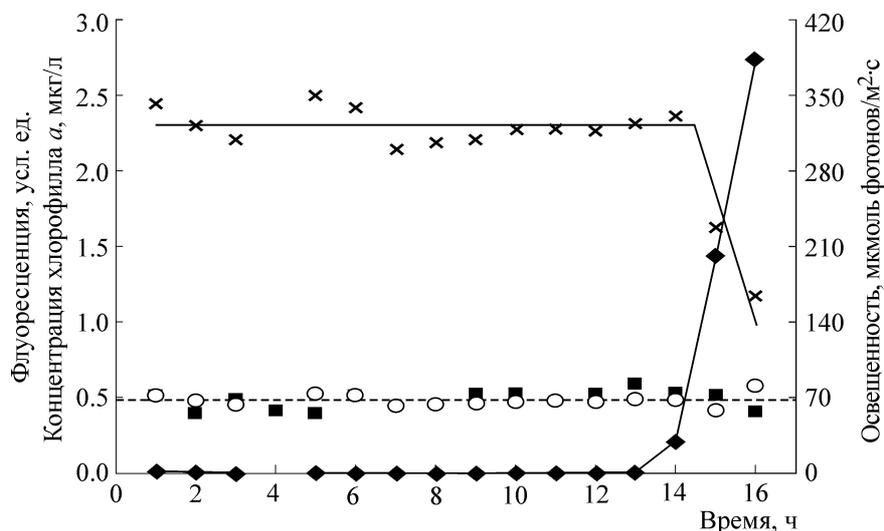


Рис. 5. Концентрация хлорофилла *a*, рассчитанная с учетом воздействия освещенности. Ромбы – измеренная освещенность, крестики – измеренная флуоресценция, квадраты – концентрация, измеренная экстрактным методом, кружки – концентрация, рассчитанная по формулам (1) и (2).

ресценции при температуре 3°C для образца с концентрацией  $10^5$  клеток/мл. Следовательно, относительная погрешность определения концентрации хлорофилла без учета температуры может достигать 2–5 раз.

Это доказывает необходимость учета влияния температуры при флуоресцентном определении концентрации хлорофилла *a* в воде, особенно при построении вертикальных профилей распределения, когда разность температуры между поверхностью и глубиной может достигать десятков градусов Цельсия.

#### РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a*

Коэффициент  $K$  в выражении (2) позволяет учесть влияние параметров среды на флуоресценцию фитопланктона и получить в результате более точное значение концентрации хлорофилла *a*. Рассмотрим применение разработанной методики при обработке результатов флуоресцентных измерений на суточной станции в бухте Витязь в сентябре 2013 г. На рис. 5 показаны результаты измерений флуоресценции и освещенности на глубине 4 м. Концентрацию хлорофилла *a* определяли экстрактным методом

по взятым пробам. Расчет концентрации хлорофилла выполняли по формуле (1), при этом коэффициент  $K$  определяли по уравнению (2), а значения функций  $s_1(Q)$  и  $s_2(T)$  вычисляли по формулам (6) и (9).

Температура воды в этот период в течение суток практически не изменялась и была равна в среднем  $20^\circ\text{C}$ . По результатам измерений флуоресценции и освещенности в период с 9:00 до 11:00 часов по формуле (4) был вычислен коэффициент  $k = 0,005$  и определены значения  $f_{\max} = 2,3$  усл.ед. и  $Q_1 = 120$  мкмоль фотонов/( $\text{м}^2 \cdot \text{с}$ ). Подставляя найденные численные значения в формулу (6) и принимая во внимание, что освещенность не превышает значения  $Q_2$ , получим выражение для вычисления  $s_1(Q)$  в следующем виде:

$$s_1(Q) = \begin{cases} 1, & \text{при } Q \leq 120 \\ 2,3 / (2,3 + 0,005(Q - 120)), & \text{при } 120 < Q < Q_2. \end{cases}$$

Принимая коэффициент температурной чувствительности  $a = 0,028$  для расчета  $s_2(T)$ , как это было найдено в лабораторном эксперименте с культурой *Isochrysis galbana*, из уравнения (9) получим выражение для вычисления  $s_2(T)$  в следующем виде:

$$s_2(T) = e^{(0,028T)}.$$

Подставляя в уравнение  $T = 20^\circ\text{C}$ , вычислим значение  $s_2(20) = 1,75$ . Подставляя коэффициент  $K$  из уравнения (2) в выражение (1), получим уравнение для расчета концентрации хлорофилла  $a$ :

$$C = KF = [s_0 s_1(Q) s_2(T)] F. \quad (10)$$

Неизвестный коэффициент  $s_0$  может быть вычислен из этого уравнения при известной концентрации  $C$ , измеренной экстрактным методом, т.е.:

$$s_0 = \frac{C}{[s_1(Q) s_2(T)] F}. \quad (11)$$

Подставляя в уравнение (10) значения  $C = 0,48$  мкг/л,  $F = 2,3$  отн. ед. и определенные ранее значения для  $s_1 = 1$  и  $s_2 = 1,75$ , найдем коэффициент  $s_0$ :

$$s_0 = \frac{0,48}{1 \cdot 1,75 \cdot 2,3} = 0,12 \text{ {мкг/л}/Вт}.$$

Как видно на рис. 5, данные, полученные в результате экстрактного метода измерения концентрации хлорофилла  $a$ , и данные, полученные в результате флуоресцентного метода определе-

ния, хорошо соотносятся между собой. Это подтверждает возможность применения предложенного в статье метода расчета концентрации при определении концентрации хлорофилла  $a$  посредством флуоресцентных измерений.

Зная коэффициент  $s_0$  и зависимости  $s_1(Q)$  и  $s_2(T)$ , можем рассчитать концентрацию хлорофилла  $a$  по формулам (1) и (10). Важно заметить, что в данной работе  $s_0$  был найден при  $s_2(20) \neq 1$ , а следовательно, коэффициент  $K$  примет значение:

$$K = s_0 s_2(20).$$

Если считать концентрацию хлорофилла  $a$ , измеренную экстрактным методом, эталонной, то можно рассчитать ошибку, возникающую при расчете концентрации из флуоресцентных измерений. Для классического метода ошибка составляет 14,7%, для метода, описанного в данной статье, – 13,8%.

Если принять, что видовой состав фитопланктона в районе, где проводились исследования, не изменяется, тогда и коэффициент  $s_0$ , а следовательно, и  $K$  можно считать постоянными. По результатам флуоресцентных измерений, проведенных в нескольких экспедициях, был проведен расчет концентрации фитопланктона классическим методом по уравнению (1) и методом, предложенным в данной статье – по уравнению (10). На рис. 6, 7 приведены полученные значения концентрации для обоих вариантов расчета.

На рис. 6 видно, что освещенность находится ниже критической и  $s_1(Q) = 1$ . Температура с глубиной изменяется в пределах от  $20$  до  $4^\circ\text{C}$ , вызывая изменение флуоресценции на глубинах 20–35 м. На рис. 6 концентрация, рассчитанная по формуле (1), изображена утолщенной линией, а рассчитанная по формуле (10) показана тонкой линией. Так как коэффициент  $s_0$  был найден при температуре  $20^\circ\text{C}$ , то максимальное совпадение рассчитанных концентраций наблюдается при данной температуре. При изменении температуры разница между значениями концентрации растет. Максимальная разница составляет 0,62 мкг/л.

На рис. 7 представлены данные, полученные при измерениях на глубинах до 20 м. Как видно на рисунке, температура в исследуемом диапазоне глубин почти не изменяется. Освещенность изменяется от 950 до 6 мкмоль фотонов/( $\text{м}^2 \cdot \text{с}$ ) и оказывает существенное влияние на флуоресценцию хлорофилла  $a$ . Максимальная разница между значениями концентрации также достигает 6,6 мкг/л.

Наличие расхождений значений концентрации, рассчитанной двумя способами: классическим методом и методом, предложенным в дан-

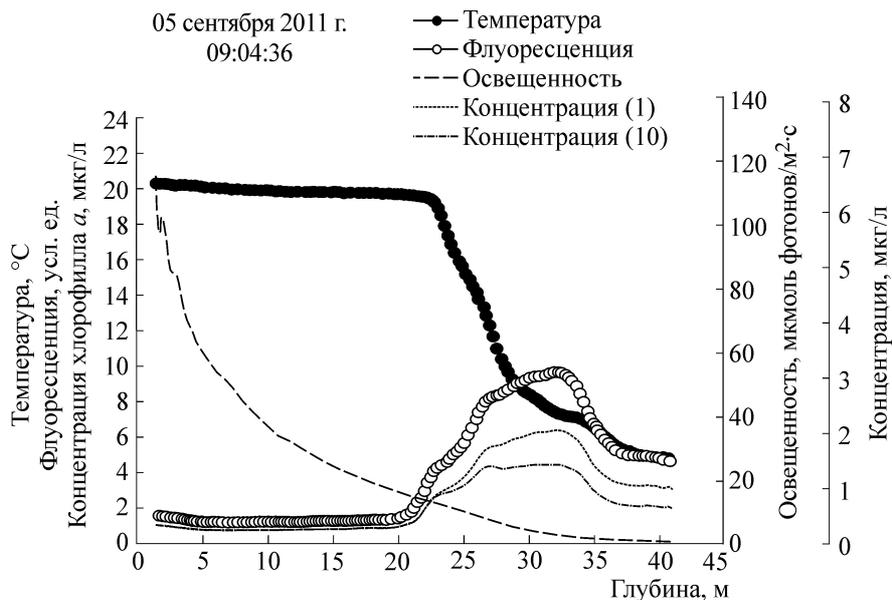


Рис. 6. Распределение параметров воды, флуоресценции и концентрации хлорофилла *a* по глубине. Измерения проведены 05.09.2011 г.

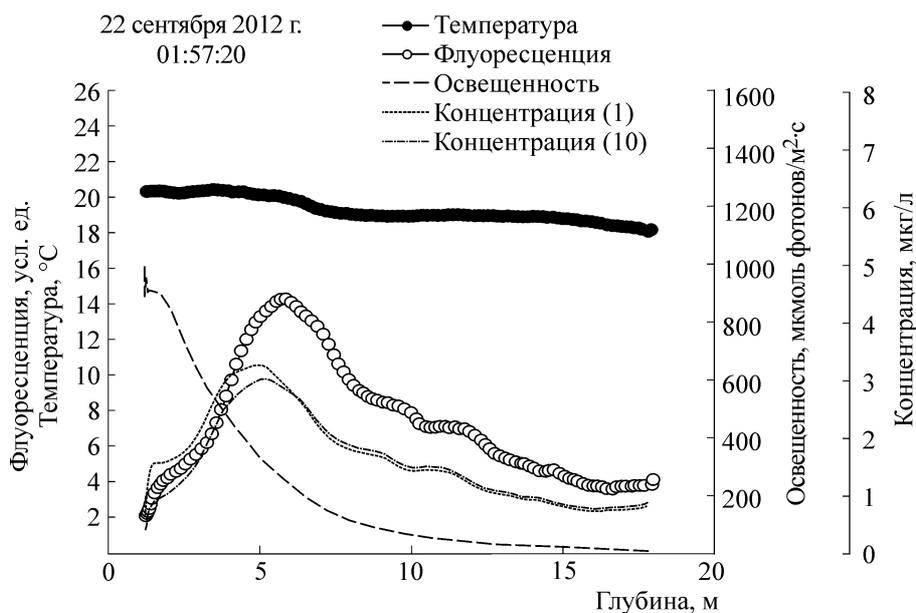


Рис. 7. Распределение параметров воды, флуоресценции и концентрации хлорофилла *a* по глубине. Измерения проведены 22.09.2012 г.

ной работе, позволяет сделать вывод о необходимости проведения ряда экспедиционных и лабораторных исследований с целью более детального исследования зависимости флуоресценции фитопланктона от параметров среды.

#### ВЫВОДЫ

В работе представлено теоретическое и экспериментальное подтверждение зависимости

флуоресценции хлорофилла *a* от параметров среды, таких как температура и освещенность. Разработаны и экспериментально подтверждены модели данных зависимостей. Составлено выражение для коэффициента *K*, необходимого для расчета концентрации хлорофилла *a*, по флуоресцентным измерениям и показано практическое применение данного алгоритма. Ошибка определения концентрации хлорофилла *a*, при расчете по методике, предложенной

в данной статье, может быть снижена в три раза по сравнению с ошибкой определения концентрации классическим методом.

Существует необходимость дальнейших исследований влияния факторов среды на флуоресценцию хлорофилла *a*. Очень важным является изучение влияния такого важного фактора, как концентрация питательных веществ в воде. Необходимо также провести ряд измерений хлорофилла *a* концентрации при помощи экстракционного метода для сравнительного анализа полученных данных флуоресцентных измерений, например данных вертикального распределения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Карнаухов, *Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды* (Наука, М., 2001).
2. T. J. Cowles, R. A. Desiderio, and S. Neuer, *Marine Biology I* (115), 217 (1993).
3. R. M. Brennan and R. A. Jefferies, *Ann. App. Biol.* **117**, 667 (1990).
4. T. K. Antal, D. N. Matorin, B. A. Levenko, et al., *Moscow Univ. Biol. Bull.* **16** (3), 25 (2000).
5. D. A. Kiefer, *Marine Biology I* (23), 39 (1973).
6. O. Herlory, P. Richard, and G. F. Blanchard, *Marine Biology I* (153), 91 (2007).
7. R. G. Perkins, J-L. Mouget, S. Lefebvre, and J. Lavaud, *Marine Biology I* (149), 703 (2006).
8. Ф. Я. Сидько, А. Д. Апонасенко и Л. А. Балакчина, *Океанология* **29** (1), 127 (1988).
9. M. J. Dring, V. Makarov, E. Schoschina, et al., *Marine Biology I* (126), 183 (1996).
10. B. Cordi, M. H. Depledge, D. N. Price, et al., *Marine Biology I* (130), 41 (1997).
11. E. Piri, M. Babaeian, A. Tavassoli, and Y. Esmailian, *African J. Microbiol. Res.* **5** (14), 1710 (2011).
12. P. G. Falkowski, A. Sukenik, and R. Herzig, *J. Phycol.* **25**, 471 (1989).
13. J. H. Martin, K. H. Coale, K. S. Johnson, et al., *Nature* **371**, 123 (1994).
14. F. L. Figueroa, *J. Limnology* **68** (2), 206 (2009).
15. Датчик WETStar. WETLabs [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.wetlabs.com/content/wetstar>
16. Е. Л. Гамаюнов, С. С. Вознесенский, А. А. Коротенко и А. Ю. Попик, *Приборы и техника эксперимента*, № 2, 135 (2012).
17. D. A. Kiefer, *Marine Biology* **22**, 263 (1973).
18. А. В. Матвеев, В. М. Пахалуев и С. Е. Щеклеин, *Альтернативная энергетика и экология*, № 4 (48), 128 (2007).
19. U. Schreiber, *Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Ed. by G. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004), pp. 279–319.
20. Д. Ю. Корнеев, *Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла* (Альтерпрес, 2002).
21. P. H. Homann, *Pl. Physiol.* **44**, 932 (1969).
22. N. Murata, and K. Sugahara, *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 82 (1969).
23. R. C. Jennings and I. Ohad, *Sci. Lett.* **1**, 3 (1973).
24. О. А. Букин, М. С. Пермяков, А. Ю. Майор и др., *Оптика атмосферы и океана* **14** (3), 223 (2001).
25. R. Barbini, F. Colao, R. Fantoni, et al., *Int. J. Remote sensing* **22** (2, 3), 369 (2001).
26. А. А. Демидов, Е. В. Баулин, В. В. Фадеев и Л. А. Шур, *Океанология* **21** (1), 174 (1981).
27. A. M. F. Pinto, E. Von Sperling, and R. M. Moreira, *Water Res.* **35** (16), 3977 (2001).

## The Dependence of Fluorescence in Phytoplankton on External Influences

E.L. Gamayunov and A.Yu. Popik

*Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Radio 5, Vladivostok, 690041 Russia*

Phytoplankton is the main source of oxygen and the primary link in the food chain for water objects; it plays an important role in their ecological state. The influence of environment parameters on intensity of fluorescence is not considered when measuring concentration by a fluorescence method. In this work the dependence between fluorescence of chlorophyll *a* contained in phytoplankton cells and the water temperature and illuminating intensity is theoretically and experimentally proved. The formula for a coefficient of proportionality which allows calculating concentration of chlorophyll *a* is offered taking into account environment parameters. The use of the coefficient calculated in this study allows reducing an error when chlorophyll *a* concentration is measured by the fluorescence method. Distributions of the phytoplankton chlorophyll concentration in depth calculated with the use of a conventional technique and the coefficient obtained are shown. Phytoplankton fluorescence was measured by a fibro-optic spectrometer in the water area of the Peter Velikiy Bay in September–October, 2013.

*Key words: phytoplankton concentration, fluorescence, environmental monitoring*