

## ЗАВИСИМОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИТОПЛАНКТОНА ОТ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕСС-ФАКТОРА

© 2016 г. С.С. Вознесенский\* \*\*, А.Ю. Попик\* \*\*, Е.Л. Гамаюнов\* \*\*,  
Ж.В. Маркина\*\*\*, Т.Ю. Орлова\*\*\*

\*Дальневосточный федеральный университет, 690091, Владивосток, ул. Суханова, 8;

\*\*Институт автоматизации и процессов управления Дальневосточного отделения РАН,  
690041, Владивосток, ул. Радио 5;

\*\*\*Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН,  
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

E-mail: PopikAY@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.06.15 г.

После доработки 14.07.15 г.

Представлены результаты исследования температурной зависимости лазерно-индуцированной флуоресценции для четырех культур морских микроводорослей, принадлежащих разным отделам. Исследованы флуоресцентные свойства микроводорослей при воздействии стрессовых температур, вплоть до значений, при которых происходят необратимые изменения в клетках культуры. Выполнен сравнительный анализ, построены модели зависимости интенсивности лазерно-индуцированной флуоресценции от температуры для пигментов в составе клеток микроводорослей. Характер зависимости интенсивности флуоресценции от температурного стресс-фактора и значения стрессовой температуры отличаются для разных культур микроводорослей и могут служить характерными признаками вида.

*Ключевые слова:* микроводоросли, фитопланктон, лазерно-индуцированная флуоресценция, температурный стресс-фактор.

Исследование морских живых организмов с целью использования их в жизнедеятельности человека является одной из важнейших задач биологии и биофизики в частности [1–4]. В последние годы активно исследуются живые организмы, отличающиеся повышенной чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов, как возможные биоиндикаторы для экологического мониторинга состояния акваторий. Одноклеточные микроорганизмы, в том числе микроводоросли фитопланктона, благодаря своим малым размерам и высокой скорости внутриклеточных обменных процессов быстро реагируют на изменения, происходящие в среде их обитания [1,5,6]. Кроме того, одним из важных свойств одноклеточных водорослей является флуоресцентное свечение пигментов клетки, вызываемое лазерным излучением и носящее название лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ). ЛИФ широко используется в современных методиках и приборах при исследовании состояния фитопланктона и изме-

рения концентрации микроводорослей [7–9] непосредственно в среде обитания без повреждения клеток. Известно [10,11], что флуоресцентный отклик клеток микроводорослей зависит не только от вида и концентрации культуры, величины рН, но и от условий, в которых они находятся во время измерений: температуры и освещенности [12–14], присутствия растворенных в воде органических и неорганических веществ [16,17]. Однако влияние быстро изменяющихся условий среды обитания (стресс-факторов) на спектры ЛИФ микроводорослей практически не исследовалось. В настоящей статье представлены результаты исследования влияния температурного стресс-фактора на спектры ЛИФ четырех культур, принадлежащих разным отделам микроводорослей.

### МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

Для исследований были выбраны четыре образца микроводорослей из коллекции Института биологии моря Дальневосточного отделения РАН, происходящие из залива Петра Великого Японского моря и выделенные в куль-

Сокращение: ЛИФ – лазерно-индуцированная флуоресценция.

Таблица 1. Основные пигменты исследованных микроводорослей

Отдел	Хлорофиллы	Фикобилины	Основные каротиноиды	Основные ксантофиллы
<i>Cryptophyta</i>	<i>a</i> , <i>c2</i>	<i>B</i> -фикоэритрин (545), <i>R</i> -фикоцианин, аллофикоцианин	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\epsilon$ -каротин	Аллоксантин
<i>Ochromytha</i>	<i>a</i> , <i>c1</i> , <i>c2</i> , <i>c3</i>	Отсутствуют	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\epsilon$ -каротин	Фукоксантин, виолоксантин
<i>Haptophyta</i>	<i>a</i> , <i>c1</i> , <i>c2</i>	Отсутствуют	$\alpha$ -, $\beta$ -каротин	Фукоксантин

туру Н.А. Айздайчер. Все они характеризуются высокой подвижностью, клетки одиночные.

*Plagioselmis prolunga* Butch. (*Cryptophyta*), штамм PP-02. Средний размер клеток составляет  $7,0 \pm 0,5$  мкм в длину и  $3,5 \pm 0,4$  мкм в ширину.

*Chroomonas salina* (Wisl.) Butch (*Cryptophyta*), штамм CS-92. Клетки 10–14 мкм в длину, 5–8 мкм в ширину овальные или эллипсоидные.

*Heterosigma akashiwo* Nada (*Ochromytha*), штамм HA-3P 11. Клетки размером 9,7 мкм на 15,3 мкм.

*Tisochrysis lutea* Bendif Probert (*Haptophyta*), штамм TL-V 08. Клетки размером 5,7 мкм на 7,5 мкм, эллипсоидные.

Культуры водорослей выращивали в питательной среде *f* [18], приготовленной на основе фильтрованной и пастеризованной морской воды соленостью 32‰. Водоросли культивировали при освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с) на поверхности колб со светотемновым периодом 12 ч (свет): 12 ч (темнота). Для посева использовали культуру в экспоненциальной фазе роста [19].

Спектры ЛИФ водорослей характеризуются различным пигментным составом [20], примеры разного пигментного состава приведены в табл. 1. Тем не менее главным пигментом, который вносит наибольший вклад в спектры ЛИФ каждой водоросли, является хлорофилл *a*.

Возбуждение ЛИФ осуществляли непрерывным лазерным излучением с длиной волны 442 нм. Время воздействия лазерного излучения на пробу во всех случаях составляло 2 с. Спектры ЛИФ фитопланктона при разной температуре измеряли спектрометром Shamrock 303i (Andor Technology, США) (входная щель монохроматора 100 мкм, диапазон длин волн 500–770 нм, разрешающая способность дифракционной решетки 0,167 нм). Измерение спектров осуществляли в режиме аккумуляции: время экспозиции промежуточного спектра 0,2 с, количество аккумуляций – 10, частота измерений промежуточных спектров 5 Гц.

Кюветы с пробами культур помещали в термостатируемый держатель кювет QPOD 2e производства компании Quantum (США), который обеспечивал скорость изменения температуры 1°С/мин. Погрешность цифрового измерителя с погружаемой термопарой составляла  $\pm 0,15$ °С. Равномерное распределение температуры обеспечивалось перемешиванием образца магнитной мешалкой со скоростью вращения 300 об/мин.

#### ВЫПОЛНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

В кварцевую кювету объемом 3,5 мл при помощи дозатора перенесли культуру микроводоросли объемом 1,5 мл. Кювету помещали в термостатируемый держатель с начальной температурой 20°С и измеряли ЛИФ культуры при изменении температуры среды до 80°С. Измерения спектров ЛИФ выполняли с шагом изменения температуры 1°С. Для каждой культуры процедуру измерений повторяли не менее трех раз.

При формировании графиков полученные в экспериментах данные обрабатывались следующим образом:

1. Из спектров ЛИФ вычитали темновой ток спектрометра.

2. Для уменьшения зашумленности сигнала полученные данные подвергали фильтрации (с помощью быстрого преобразования Фурье) для частот выше 0,5 Гц.

3. После фильтрации определяли интенсивности максимума флуоресценции в диапазоне длин волн 680–690 нм и комбинационного рассеяния воды.

4. Для всех культур была произведена нормировка интенсивности ЛИФ на интенсивность комбинационного рассеяния воды по формуле:

$$f_n(T) = \frac{I_{\max}}{I_{\text{кр}}}, \quad (1)$$

где  $T$  – температура образца,  $I_{\max}$  – максимальная интенсивность ЛИФ в диапазоне длин волн

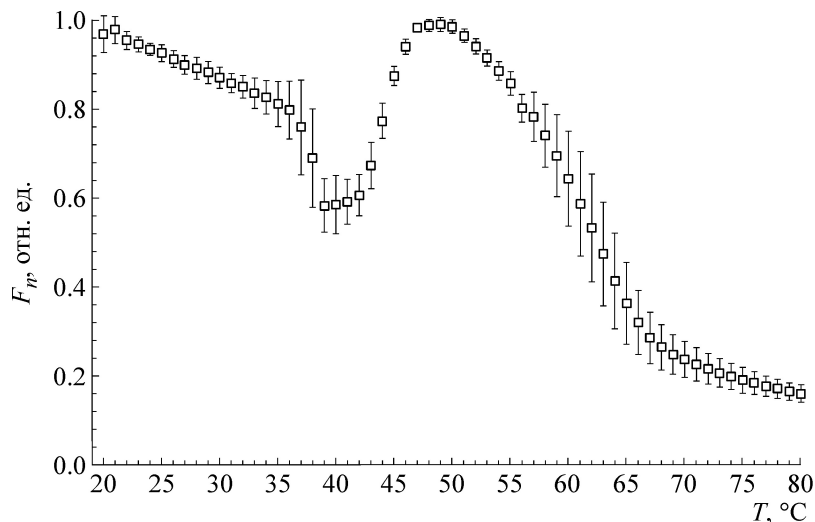


Рис. 1. Температурная зависимость интенсивности ЛИФ *Chroomonas salina*.

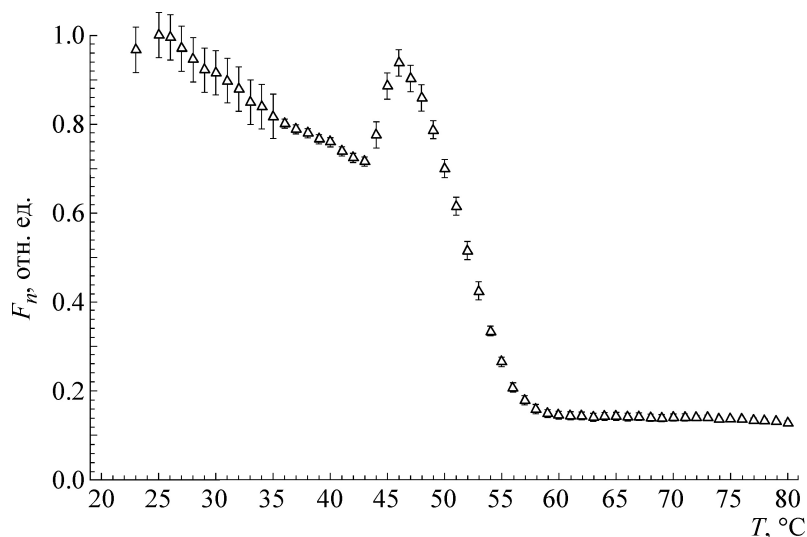


Рис. 2. Температурная зависимость интенсивности ЛИФ *Heterosigma akashiwo*.

680–690 нм при заданной температуре,  $I_{кр}$  – интенсивность комбинационного рассеяния воды при заданной температуре,  $f_n(T)$  – интенсивность ЛИФ в диапазоне длин волн 680–690 нм нормированная на соответствующую интенсивность комбинационного рассеяния воды при одинаковых заданных значениях температуры.

5. Значения интенсивности ЛИФ были нормированы на максимальную интенсивность ЛИФ по формуле:

$$F_n(T) = \frac{f_n(T)}{f_{max}}, \quad (2)$$

где  $f_{max}$  – максимальная интенсивность нормированной ЛИФ в диапазоне длин волн 680–690 нм,  $F_n(T)$  – интенсивность ЛИФ, нормированная на максимальную, при заданной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1–4 представлены результаты измерений флуоресценции каждой культуры микроводорослей в диапазоне температур 20–80°C. Каждая точка на графиках является результатом усреднения  $F_n(T)$  по трем независимым экспериментам.

Анализ графиков позволяет выделить характерные участки изменения интенсивности

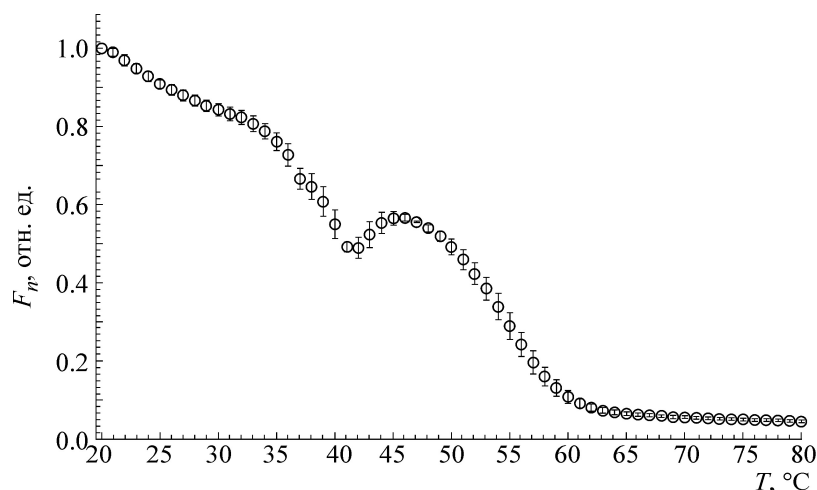


Рис. 3. Температурная зависимость интенсивности ЛИФ *Plagioselmis prolonga*.

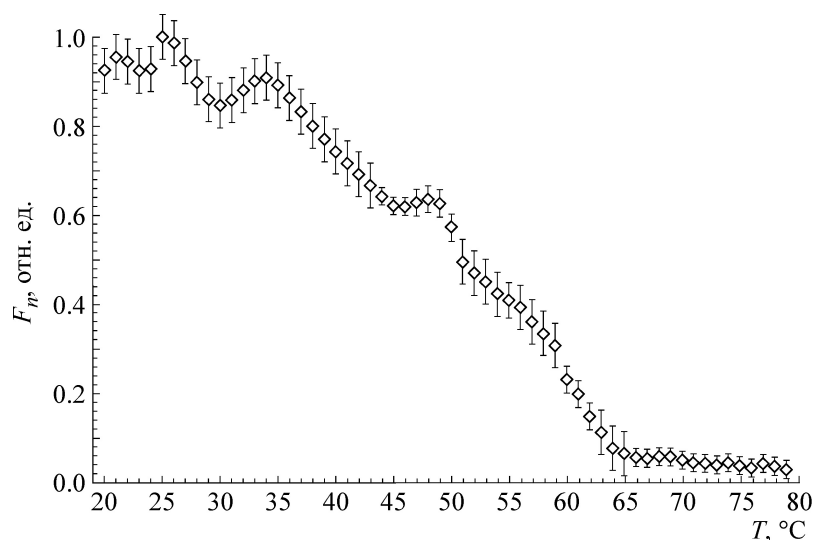


Рис. 4. Температурная зависимость интенсивности ЛИФ *Tisochrysis lutea*.

ЛИФ от температуры, в то же время имеющие разную степень выраженности для каждой культуры:

1). Диапазон 20–35°C – монотонное уменьшение интенсивности флуоресценции.

2). Диапазон 35–42°C – для криптофитовых водорослей *Plagioselmis prolonga* и *Chroomonas salina*, отличительной особенностью которых является наличие пигментов фикобилинов, наблюдается ускорение уменьшения интенсивности флуоресценции хлорофилла *a*, в то время как у двух других водорослей характер уменьшения интенсивности остается прежним.

3). Диапазон 42–50°C – быстрое увеличение интенсивности флуоресценции до выраженного максимального значения.

4). Диапазон 50–80°C – монотонный спад интенсивности флуоресценции с последующей стабилизацией на минимальном уровне.

Значения максимальной и минимальной температуры ( $T_{\min}$  и  $T_{\max}$  соответственно) и амплитуды ( $F_n(T_{\min})$  и  $F_n(T_{\max})$  соответственно) для характерных точек температурной зависимости интенсивности флуоресценции исследованных культур микроводорослей приведены в табл. 2.

Согласно работам [12,21], явление уменьшения интенсивности флуоресценции с ростом температуры, так называемое температурное тушение флуоресценции, обусловлено повышением колебательной энергии молекул вещества, которое приводит к дезактивации возбужден-

**Таблица 2.** Значения температуры и амплитуды интенсивности флуоресценции для характерных точек температурной зависимости ЛИФ микроводорослей

Культура	$T_{\min}$ , °C	$F_n(T_{\min})$	$T_{\max}$ , °C	$F_n(T_{\max})$
<i>Chroomonas salina</i>	40	0,5	49	1,0
<i>Heterosigma akashiwo</i>	43	0,7	46	0,92
<i>Plagioselmis prolunga</i>	41	0,5	46	0,56
<i>Tisochrysis lutea</i>	45	0,6	47	0,65

**Таблица 3.** Температурный коэффициент флуоресценции исследованных культур

Культура	$a$	$s$
<i>Chroomonas salina</i>	-0,0073	0,07
<i>Heterosigma akashiwo</i>	-0,0035	0,12
<i>Plagioselmis prolunga</i>	-0,017	0,015
<i>Tisochrysis lutea</i>	-0,0080	0,09

ных уровней в результате безызлучательной колебательной релаксации молекул и, следовательно, к понижению квантового выхода флюо-

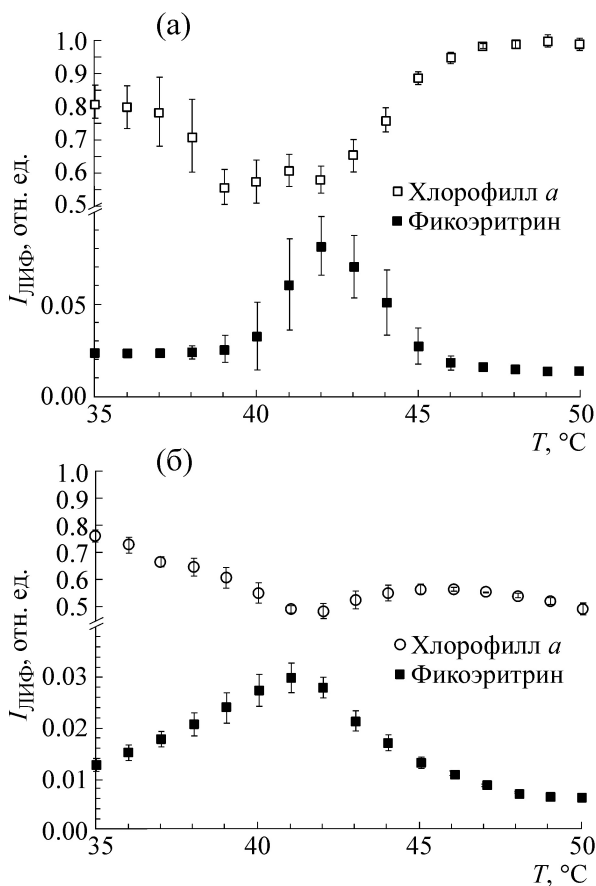
ресценции. В нашем случае наблюдаемое в диапазоне 20–33°C уменьшение интенсивности флуоресценции имеет характер нефотохимического тушения и вызвано воздействием температуры на молекулы хлорофилла  $a$ , находящегося в составе клеток микроводорослей. В работах [12,22] показано, что в данном диапазоне температур интенсивность флуоресценции экспоненциально спадает при постепенном увеличении температуры, и полученные экспериментальные данные хорошо аппроксимируются экспоненциальной функцией  $\varphi(T)$ :

$$\varphi(T) = f_0 e^{(-aT)}, \quad (3)$$

где  $f_0$  – максимальная интенсивность флуоресценции в отсутствие температурного тушения;  $T$  – температура среды, из которой можно определить параметр  $a$  как температурный коэффициент флуоресценции микроводорослей. Значения температурного коэффициента флуоресценции ( $a$ ) для исследованных культур микроводорослей и максимальные отклонения экспериментальных данных от рассчитанных методом наименьших квадратов ( $s$ ) представлены в табл. 3.

Достижение выраженного минимума интенсивности флуоресценции в диапазоне температур 35–42°C, по-видимому, связано с началом денатурации белковых структур в клетках микроводорослей и последующей их гибели. При этом для криптофитовых водорослей происходит нарушение в работе цепи транспорта электронов, из-за которой прекращается передача энергии, поглощенной другими пигментами, на хлорофилл  $a$ . Это хорошо видно по увеличению интенсивности флуоресценции фикобилинов в клетках криптофитовых водорослей в диапазоне температур 35–42°C (рис. 5).

Дальнейшее повышение температуры до 46–50°C приводит к интенсивному разрушению оболочек и внутренних компонентов клеток и, как следствие, высвобождению молекул свободного хлорофилла  $a$ , интенсивность флуоресценции которого, как известно [21,22], всегда выше флуоресценции хлорофилла  $a$ , связанного в хлоропластах клеток. Поэтому в данном диапазоне

**Рис. 5.** Синхронные изменения интенсивности ЛИФ хлорофилла  $a$  и фикобилинов в клетках криптофитовых водорослей. (а) – *Chroomonas salina*; (б) – *Plagioselmis prolunga*.

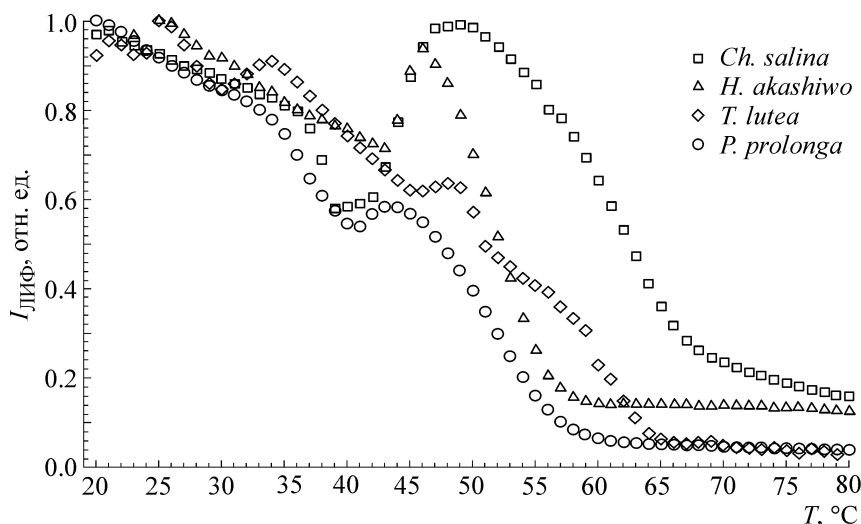


Рис. 6. Сравнение температурной зависимости интенсивности ЛИФ исследованных культур микроводорослей.

температур наблюдается достаточно интенсивный рост флуоресценции до выраженного максимального значения.

Дальнейшее увеличение температуры приводит к спаду флуоресценции вследствие увеличения безызлучательной релаксации и разрушения молекул хлорофилла *a*.

### ВЫВОДЫ

Увеличение температуры среды до начала существенных необратимых изменений белковых структур в клетках микроводорослей приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* и, следовательно, должно учитываться при вычислении концентрации хлорофилла *a* в тех случаях, когда температура воды изменяется, например, в течение времени, а также при определении вертикального профиля распределения фитопланктона.

Характер зависимости интенсивности флуоресценции от температурного стресс-фактора и значения температуры, при которых наблюдаются минимальный и максимальный уровни интенсивности флуоресценции, отличаются для разных культур микроводорослей (рис. 6) и могут служить характерными признаками каждого отдельного вида. Кроме того, значение температурного коэффициента *a* также может быть использовано как отличительный признак для идентификации культур микроводорослей.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Лазерные методы исследования» Института автоматики и процессов управления Дальневосточного отделения РАН и поддержана грантом Российского научного фонда

(соглашение № 14-50-00034) в части экспериментальных исследований и грантами ДВО РАН (Программа «Дальний Восток») в части получения культур микроводорослей и обработки результатов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. В. Котелевцев, Д. Н. Маторин и А. П. Садчиков, *Эколого-токсикологический анализ растительных сообществ в водных экосистемах* (Альтекс, М., 2012).
2. P. A. Kameneva, A. B. Imbs, and T. Yu. Orlova, *Toxicol* **98**, 1 (2015).
3. T. V. Ryazanova, M. G. Eliseikina, I. M. Kalabekov, and N. A. Odintsova, *J. Invertebrate Pathol.* **127**, 21 (2015).
4. I. A. Beleneva, E. V. Shamshurina, and M. G. Eliseikina, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **115**, 263 (2015).
5. Ю. Н. Кульчин, С. С. Вознесенский, Е. Л. Гамаюнов и др., *Оптика атмосферы и океана* **26**, 40 (2013).
6. А. Б. Рубин, *Сорос. образов. журн.* **6**, 7 (2000).
7. С. С. Вознесенский, Е. Л. Гамаюнов, А. Ю. Попик и А. А. Коротенко, *Приборы и техника эксперимента* **3**, 97 (2014).
8. Е. Л. Гамаюнов, С. С. Вознесенский, А. А. Коротенко и А. Ю. Попик, *Приборы и техника эксперимента* **2**, 135 (2012).
9. Пат. 2426779 Российская Федерация, МПК 7 C12N 1/12, C12N 11/02, C12Q 1/06, G01N 33/18. Е.Н. Ефременко, А.В. Холстов, Е.Н. Воронова и др., № 2009141878/10.; заявл. 13.11.2009; опубл. 20.08.2011, Бюл. № 23, 15 с.
10. Д. Н. Маторин, В. А. Осипов, О. В. Яковлева и др., *Вода: химия и экология* **4**, 44 (2011).
11. О. А. Букин, М. С. Пермяков, А. Н. Павлов и А. Ю. Майор, *Оптика атмосферы и океана* **13**, 847 (2000).

12. Е. Л. Гамаюнов и А. Ю. Попик, *Биофизика* **60** (1), 143 (2015).
13. E. L. Gamayunov and A. Yu. Popik, in: *Proc. of Intern. Conf. «Fundamental and applied sciences today IV»* (North Charleston, USA, 2014), Vol. 1, pp. 168–176.
14. E. L. Gamayunov and A. Yu. Popik, in: *Proc. of Asia-Pacific Conference on Fundamental Problems of Opto- and Microelectronicsworkshop «APCOM 2014»* (Kokushikan University, Tokyo, 2014), pp. 68–71.
15. Е. Л. Гамаюнов и А. Ю. Попик, *Материалы десятой международной научно-практической конференции «Электронные средства и системы управления»* (Томск, В-Спектр, 2014), т. 2, сс. 186–190.
16. О. А. Букин, П. А. Салюк, А. Ю. Майор и А. Н. Павлов, *Оптика атмосферы и океана* **18**, 976 (2005).
17. О. А. Букин, М. С. Пермяков, А. Ю. Майор и др., *Оптика атмосферы и океана* **13**, 1011 (2000).
18. R. R. L. Guillard and J. H. Ryther, *Can. J. Microbiol.* **8** (2), 229 (1962).
19. Т. Ю. Орлова, Н. А. Айздайчер и И. В. Стоник, *Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов: научно-методическое пособие* (Владивосток: Дальнаука, 2011).
20. L. Barsanti and P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology. Second edition* (CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014).
21. Д. Ю. Корнеев, *Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла* (Альтерпрес, К., 2002).
22. А. Б. Рубин и Т. Е. Кренделева, *Успехи биол. химии* **43**, 225 (2003).

## The Dependence of Phytoplankton Fluorescence on Thermal Stress Factor

**S.S. Voznesenskiy\* \*\*, A.YU. Popik\* \*\*, E.L. Gamayunov\* \*\*,  
Z.V. Markina\*\*\*, and T.Y. Orlova\*\*\***

*\*Far Eastern Federal University, ul. Sukhanova 8, Vladivostok, 690091 Russia*

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

*\*\*\*Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia*

This article presents the results of a study of the temperature dependence of laser-induced fluorescence for four marine microalgae cultures from different biology departments. The results of the study of the fluorescent properties of algae when exposed to temperature stress up to the point at which irreversible changes occur in cell culture are provided. A comparative analysis is carried out, the models of the dependence of the intensity of laser-induced fluorescence on the temperature for the pigments in the composition of cell microalgae are developed. The dependence of the fluorescence intensity on the thermal stress factor and temperature value is different for different cultures of microalgae and can serve as characteristic features of the species.

*Key words: microalgae, phytoplankton, laser-induced fluorescence, thermal stress factor*