

Об использовании ЗАВИСИМОСТЕЙ ПАРАМЕТРОВ флуоресценции хлорофилла от освещенности для изучения фотосинтетической активности **ФИТОПЛАНКТОНА**

Изучены быстрые световые кривые параметров флуоресценции хлорофилла природного фитопланктона водоемов Звенигородской станции МГУ. Наибольшая скорость фотосинтетического транспорта электронов и обилие фитопланктона были зарегистрированы в пробах из р. Москвы и Косинового пруда. Низкая фотосинтетическая активность фитопланктона, связанная с антропогенным воздействием, обнаружена в Ольгином пруду. Предложено использование быстрых световых кривых параметров флуоресценции хлорофилла для определения экологического благополучия фитопланктона пресных водоемов.



Введение

Планктонные микроводоросли (фитопланктон) являются основным продукционным звеном, на котором базируются все остальные компоненты водных экосистем. При действии различных экологических факторов и антропогенных загрязнений изменяется фотосинтетическая активность клеток фитопланктона [1-3]. Количество водорослей обычно оценивают по содержанию в них хлорофилла спектрофотометрическим методом [2, 3]. Более оперативными и чувствительными для решения этой задачи являются измерения интенсивности флуоресценции водорослей в природной воде.

Интенсивность флуоресценции хлорофилла при ее возбуждении светом низкой интенсивности соответствует суммарному содержанию всех пигментов. Показано, что в конкретных акваториях и условиях, характеризующихся небольшими изменениями таксономического состава водорослей, наблюдается прямая корреляция между

Д.Н. Маторин*,
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, кафедра биофизики, биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

В.А. Осипов,
кандидат биологических наук, научный сотрудник, кафедра биофизики, биологический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова

измеренной в пробе воды интенсивностью флуоресценции хлорофилла и его содержанием, измеренным спектрофотометрическим или другими аналитическими методами [2, 4].

Эффективность функционирования фотосинтетического аппарата представляется наиболее важным признаком для биоиндикации экологического благополучия и прогнозирования развития популяций фитопланктона. Этот признак имеет особенно большое значение для контроля загрязнения водной среды [1]. Для регистрации фотосинтетической активности микроводорослей в последнее время все шире применяются флуоресцентные методы. Методы регистрации флуоресценции позволяют получать информацию о количестве и активности фотосинтезирующих организмов, а также по характеристикам состояния фотосинтетического аппарата оценивать физиологичес-

* Адрес для корреспонденции: matorin@biophys.msu.ru

кое состояние клеток при действии антропогенных факторов и судить о качестве водной среды [1, 3]. Важным преимуществом флуоресцентных методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние объекта непосредственно в среде его обитания *in situ*.

В последнее время при работе с листьями и культурами водорослей активно развиваются методы быстрого измерения световых зависимостей (световых кривых) параметров флуоресценции, отражающих развитие фотохимического и нефотохимического тушения на свету, что позволяет регистрировать ранние изменения в работе фотосинтетического аппарата [5, 6]. Однако на природном фитопланктоне таких работ почти нет.

В настоящей работе метод измерения зависимостей параметров флуоресценции хлорофилла от освещенности был адаптирован к пресноводному фитопланктону на примере водоемов Звенигородской биологической станции МГУ (ЗБС МГУ). Показано, что использование этих зависимостей позволяет быстро регистрировать изменения в энергозапасующих фотосинтетических процессах природного фитопланктона и оценивать его состояние.

Материалы и методы исследования

Пробы фитопланктона отбирали из четырех водоемов ЗБС МГУ (р. Москва, Костиного и Стерляжьего прудов и Ольгиного (Пожарного) пруда, находящегося рядом с общежитиями), помещали в темные пластмассовые бутылки объемом 2 л, инкубировали в темноте 1 ч и измеряли параметры флуоресценции. Исследования проводили в начале августа 2007-2010 гг.

Измерения показателей флуоресценции фитопланктона проводили на импульсном флуориметре WaterPAM (Walz, Германия). Флуориметр регистрирует постоянную (F_0) и максимальную флуоресценцию (F_m), а также рассчитывает выход переменной флуоресценции (F_v/F_m) у водорослей, адаптированных к темноте.

Измерения быстрых световых зависимостей различных параметров флуоресценции проводили при последовательном увеличении интенсивности света от 0 до 900 мкЕм⁻²с⁻¹. Время освещения составляло 50 с. В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности с использованием насыщающей вспышки (0,8 с, 3000 мкЕм⁻²с⁻¹) регистрировались параметры F_m' , а также выход флуоресценции на свету F_t [7]. На

О.В. Яковлева,
кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, кафедра биофизики, биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

С.Н. Горячев,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, кафедра биофизики, биологический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова

А.Б. Рубин,
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики, биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

основании всех данных рассчитывали нефотохимическое тушение флуоресценции $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$, эффективный квантовый выход в фотосистеме 2 $Y = (F_m' - F_t) / F_m'$ и относительную скорость нециклического электронного транспорта при данной интенсивности света ($rETR$). Скорость транспорта электронов рассчитывали по формуле $rETR = E_i (F_m' - F_t) / F_m'$, где E_i – освещенность. На основании полученных световых кривых $rETR$ оценивали следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой α), максимальную относительную скорость электронов по электронно-транспортной цепи ($rETR_{max}$) и насыщающую интенсивность света (E_n). α рассчитывали как коэффициент линейной регрессии, построенной по точкам, лежащим на светолимитированном участке световой кривой, $rETR_{max}$ – как среднее по значениям $rETR$, находящимся на светонасыщающем участке, E_n рассчитывали по формуле $E_n = rETR_{max} / \alpha$. Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой [7].

Результаты и их обсуждение

Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей [1]. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтез возбуждающем свете (F_m) и условиях, не

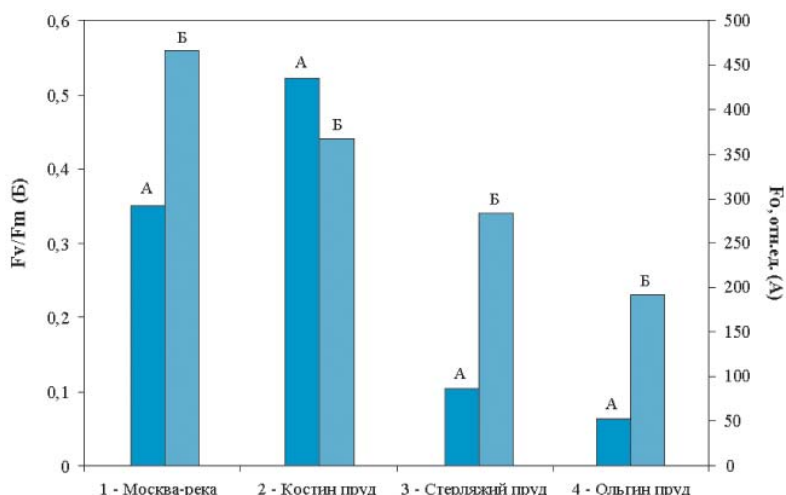


Рис. 1. Значения обилия фитопланктона (F_0) и состояния его фотосинтетической активности (F_v/F_m) в исследованных водоемах ЗБС МГУ. Водоемы перечислены в порядке убывания F_v/F_m : 1 – р. Москва; 2 – Костин пруд (световой участок); 3 – Стерляжий пруд (затененный участок); 4 – Ольгин пруд.

вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_0), позволяет определить $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$. Параметр F_v/F_m характеризует максимальную эффективность первичного фотохимического преобразования световой энергии в реакционных центрах фотосистемы 2 (ФС2). Уровень постоянной флуоресценции F_0 с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию пигментов фотосинтетического аппарата фитопланктона и, соответственно, также коррелирует с обилием фитопланктона [4]. На *рис. 1* представлены результаты измерения обилия фитопланктона по F_m и состояния его фотосинтетического аппарата по F_v/F_m .

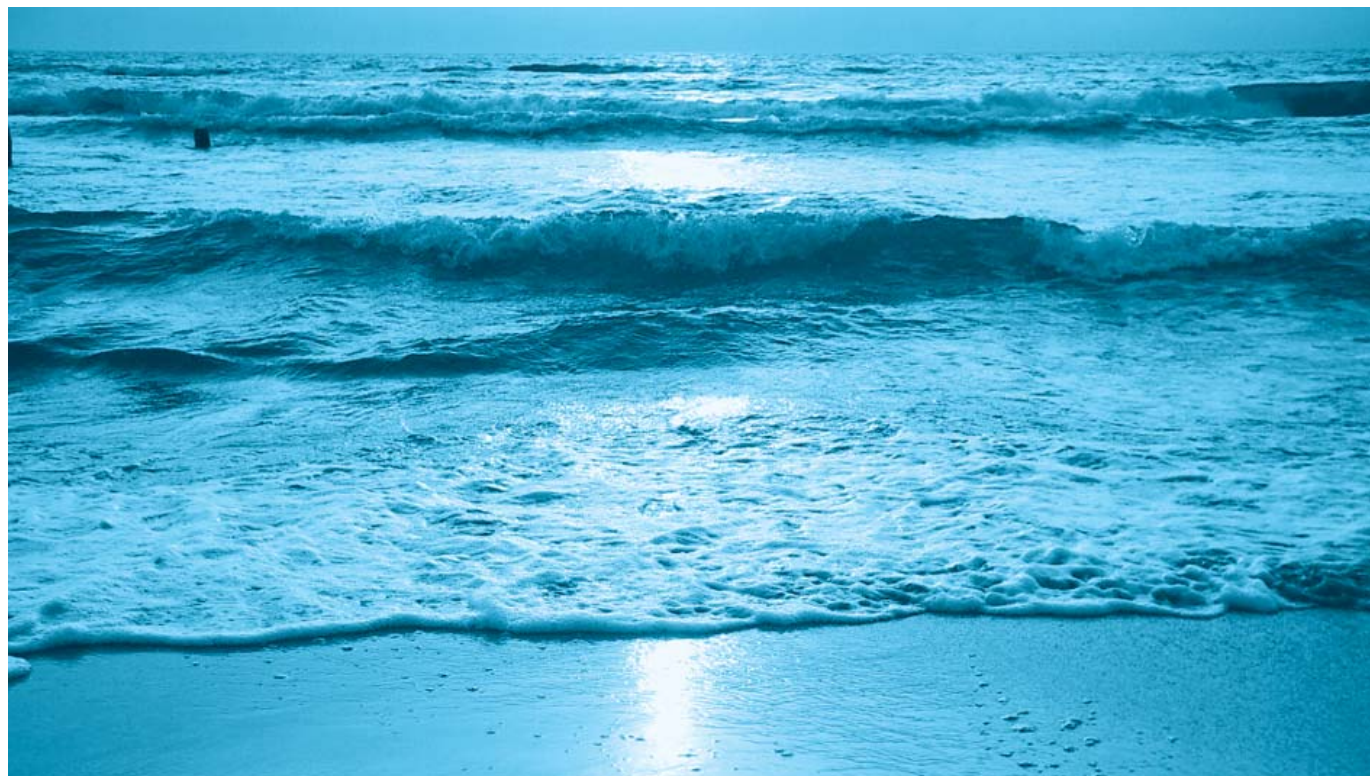
Наибольшая фотосинтетическая активность F_v/F_m была зарегистрирована в пробах из р. Москвы и Костиного пруда (световой участок). Это свидетельствует о благоприятной обстановке для жизнедеятельности фитопланктона в этих водоемах. В них наблюдались также высокие значения F_0 , свидетельствующие о значительном обилии фитопланктона, что коррелирует с оценкой концентрации хлорофилла «а», определенной прямым спектрофотометрическим методом в ацетоновых экстрактах. Концентрации хлорофилла «а» составляла 24 и 13 мкгл⁻¹ для Костиного пруда и р. Москвы, соответственно (данные представлены И.В. Конюховым). Напротив, в пробе, взятой из Ольгиного пруда, находящегося в районе общежитий на Нижних дачах, отмечено более низкое содер-

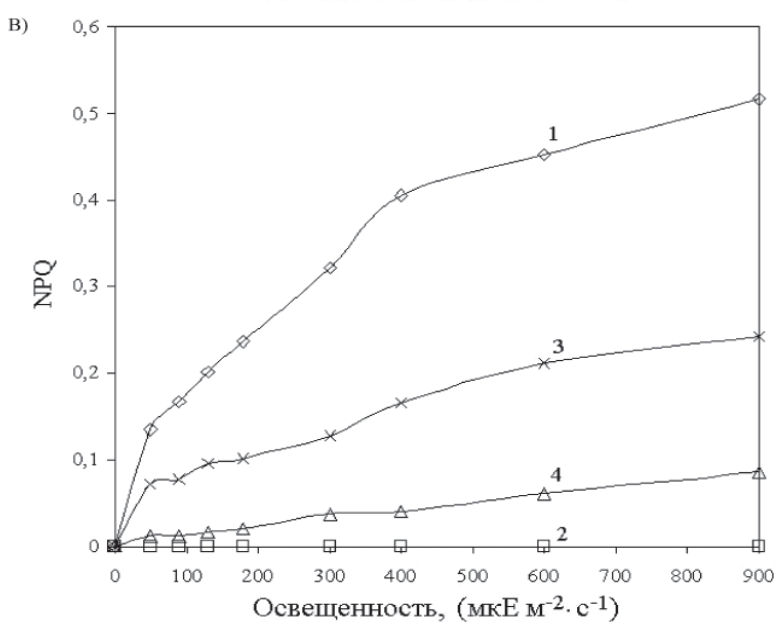
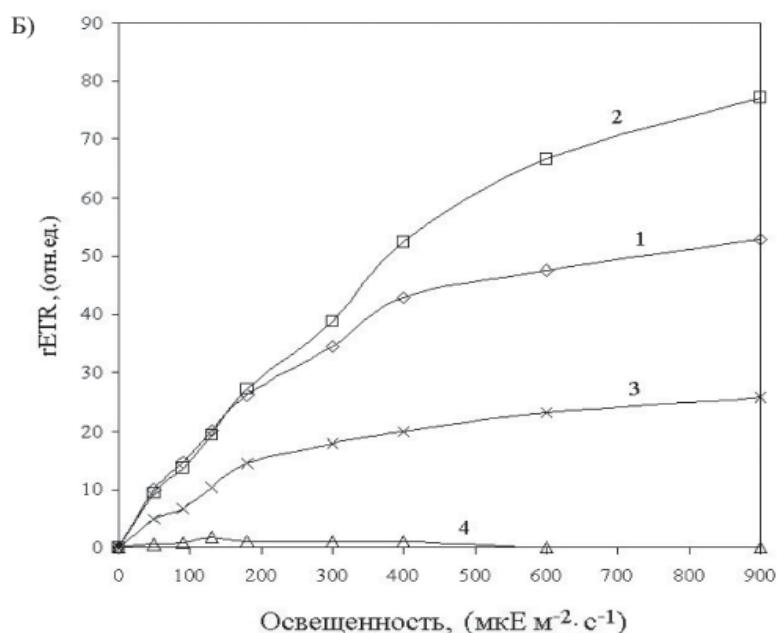
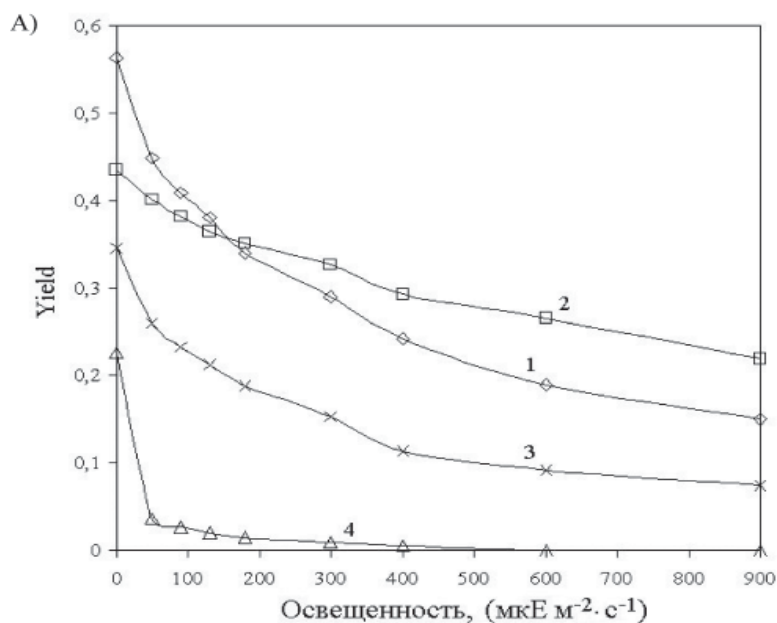
Ключевые слова:

фитопланктон,
флуоресценция
хлорофилла,
фотосинтез,
экология

жание фитопланктона по F_0 , и наименьшая фотосинтетическая активность F_v/F_m . Концентрация хлорофилла «а» находилась в диапазоне 5-7 мкгл⁻¹. Низкая фотосинтетическая активность и количество фитопланктона в Ольгином пруду, по-видимому, связаны с неблагоприятными условиями для водорослей (сильным затенением и наличием загрязняющего стока в пруд из расположенного рядом санузла ЗБС МГУ). В Стерляжем пруду (затененный участок) обилие и фотосинтетическая активность фитопланктона были средними по сравнению с другими водоемами.

Наиболее контрастные различия у фитопланктона водоемов ЗБС были выявлены при измерении и анализе параметров флуоресценции на свету при разной интенсивности, т.е. в условиях увеличивающейся световой нагрузки (см. методику). Эффективный квантовый выход в фотосистеме 2 на свету определяется как отношение $Y = (F_m' - F_t) / F_m'$ [7]. Ранее было показано, что при возрастании освещенности растений или водорослей происходит снижение фотохимического тушения и квантового выхода в ФС2 (Y) из-за общего торможения электронного транспорта вследствие лимитирования последнего скоростью функционирования темновых процессов фотосинтеза и возрастанием нефотохимического тушения [7]. Последнее отражает увеличение процессов тепловой диссипации энергии в условиях невозможности переработки избыточной





световой энергии в фотосинтезе. В наших экспериментах увеличение интенсивности освещения фитопланктона также приводило к снижению квантового выхода ФС2 – Y (рис. 2).

Однако уменьшение этого параметра в зависимости от интенсивности света было разным у фитопланктона разных водоемов. Минимальное снижение Y наблюдалось у светолюбивого фитопланктона Костина пруда, находящегося в незатененном месте. Интенсивность света, при которой значение Y фитопланктона Костина пруда уменьшалось наполовину, была достаточно высокой ($857 \text{ мкЕм}^{-2}\text{с}^{-1}$). Для фитопланктона р. Москвы и Стерляжьего пруда это значение составляло 309 и $384 \text{ мкЕм}^{-2}\text{с}^{-1}$, соответственно. Наиболее значительным спадом Y с увеличением интенсивности освещения характеризовался фитопланктон Ольгиного пруда. Уже при освещенностях выше $40 \text{ мкЕм}^{-2}\text{с}^{-1}$ значение Y было крайне низким.

Y может служить для оценки величины скорости электронного транспорта $rETR$ на свету. На листьях показана линейная корреляция между Y и квантовым выходом фиксации углекислого газа [8]. На рис. 2 представлены световые зависимости относительной скорости $rETR$ фитопланктона водоемов ЗБС. В табл. 1 приведены параметры, описывающие световые зависимости $rETR$.

Максимальная относительная скорость электронного транспорта $rETR_{max}$ была наибольшей для фитопланктона Костинского пруда. Более низкое значение $rETR_{max}$ наблюдалось для фитопланктона р. Москвы и Стерляжьего пруда. Крайне низкая скорость $rETR_{max}$ отмечалась у Ольгиного пруда, что согласуется с низкими значениями темнового F_v/F_m . Тот факт, что значение F_v/F_m у клеток Ольгиного пруда составляет 0,23 при очень низком нециклическом транспорте, указывает на то, что сохраняется некоторое количество фотосинтетических центров, но они не способны обеспечить электронный транспорт. Коэффициент максимальной утилизации световой энергии

Рис. 2. Изменения параметров флуоресценции природного фитопланктона из разных водоемов Звенигородской биологической станции МГУ (р. Москва (1), Костин (2), Стерляжий (3) и Ольгин (4) пруды) в зависимости от интенсивности действующего света. А – эффективный квантовый выход в ФС2 (Y) на свету, Б – относительная скорость нециклического электронного транспорта $rETR$, В – нефотохимическое тушение NPQ .

Таблица 1

Параметры, описывающие зависимость относительной скорости фотосинтетического транспорта электронов ($rETR$) от освещенности: коэффициент максимальной утилизации световой энергии α , максимальная относительная скорость электронов $rETR_{max}$ и насыщающая интенсивность света E_n

Параметры	р. Москва	Костин пруд	Стерляжий пруд	Ольгин пруд
$rETR_{max}$	53±6,9	77,1±9,3	25,8±3,6	0
α	0,15	0,13	0,08	Не определяется
E_n , мкЕм ⁻² с ⁻¹	345±27	572±49	321±23	Не определяется

гии α был наибольший у фитопланктона р. Москвы и Костинского пруда. В Стерляжем пруду он был меньше. Насыщающая интенсивность света E_n была максимальна для светлюбивого фитопланктона Костина пруда и составила 572 мкЕм⁻²с⁻¹. Для фитопланктона р. Москвы и Стерляжьего пруда эти значения равнялись 345 и 321 мкЕм⁻²с⁻¹, соответственно. У планктона Ольгинского пруда невозможно было определить параметры световой кривой $rETR$.

Снижение эффективного квантового выхода ФС2 Y при увеличении освещенности у водорослей связано с увеличением тепловой диссипации избыточной световой энергии, когда она не способна утилизироваться в реакциях фотосинтеза [2, 7]. Наибольшее значение нефотохимического тушения NPQ

отмечалось у фитопланктона р. Москвы, который вследствие перемешивания должен обладать активной системой адаптации к быстроменяющимся световым условиям (рис. 2В). Фитопланктон Стерляжьего пруда также показал высокое значение NPQ при высокой освещенности. Водоросли Ольгинского пруда, с низкой активностью электронного транспорта, по-видимому, не могут накачать значительный электрохимический градиент протонов и, соответственно, имеют невысокий уровень NPQ.

В отличие от других водоемов фитопланктон Костина пруда показывал очень низкое значение NPQ. Это связано с тем, что скорость электронного транспорта этих водорослей, как видно из световой кривой, не достигает полного насыщения даже при 900 мкЕм⁻²с⁻¹ и поэтому клетки не испытывают необходимости в сбросе избытка неиспользуемой энергии.

Заключение

Таким образом, исследования показали, что применение высокочувствительных флуоресцентных методов в сочетании с использованием дополнительной световой нагрузки на объект позволяют выявить особенности функционирования фитопланктона в разных водоемах и условиях его существования. Естественно, выяснение конкретных факторов, угнетающих развитие



фитопланктона (фитопланктон Ольгиного пруда) требует дополнительных анализов. Анализ ответных реакций первичных процессов фотосинтеза фитопланктона на разный режим освещения позволяет выявлять, к каким световым условиям адаптированы клетки фитопланктона, и оценивать адаптивные возможности этих организмов в районе исследований. При этом метод регистрации световых зависимостей параметров флуоресценции, примененный в настоящей работе, позволяет оценить скорость нециклического электронного транспорта, диапазон насыщающих интенсивностей и следить за процессами нефотохимического сброса неиспользуемой при фотосинтезе световой энергии. Следует отметить, что световой стресс может быть легко реализован во флуоресцентной аппаратуре для биоиндикации и включен в систему автоматизированного оперативного контроля состояния природных вод водоемов.

Работа выполнена при поддержке гранта П2219; НШ-7885.2010.4, 211/4667 на базе Звенигородской биологической станции МГУ им. С.Н. Скадовского

Литература

1. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона // Итоги науки и техники. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1990 Т.40. С. 49-100

2. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла // Учебно-методическое пособие. М.: – МГУ. Макс Пресс. 2010. 117 с.

3. Falkowski P.G., Raven J.A. Aquatic photosynthesis // Malden: Blackwell Science, 1997. 375 p.

4. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // Oceanologia. 2004. V. 46. N 4. P.519-531.

5. Herlory O., Richard P., Blanchard G. F. Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms // Mar Biol. 2007. 153: P.91–101.

6. Ralph P.J., Gademann R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity // Aquat Bot. 2005. 82: P.222–237.

7. Schreiber U. Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method // In: Papageorgiou G and Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis, 2004. P.279-319. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

8. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // Biochim. Biophys. Acta. 1989. 990: P.87–92.



D.N. Matorin, V.A. Osipov, O.V. Yakovleva, S.N. Goryachev, A.B. Rubin

INVESTIGATION OF PHYTOPLANKTON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY BY CHLOROPHYLL FLUORESCENCE PARAMETERS

Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters of a natural phytoplankton of water bodies of Zvenigorodsky station of the Moscow State University were investigated. The greatest speeds of photosynthetic electron transfer and phytoplankton abundance have been

registered in tests from the river Moscow and Kostin pond. The low photosynthetic activity of a phytoplankton connected with anthropogenic influence in Olgin pond has been found out. Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence

parameters for definition of ecological well-being of a phytoplankton of fresh water bodies have been offered.

Key words: phytoplankton, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, ecology