

УДК 551.465

КОМПЛЕКС ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА

© 2017 г. И. В. Конюхов^{1,3}, Д. И. Глуховец^{2,3}

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия*

² *Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
биологический факультет*

³ *Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва, Россия*

e-mail: vanka.kon@gmail.com

e-mail: glukhovets@ocean.ru

Поступила в редакцию 20.06.2015 г.

В статье обсуждаются результаты совместных оптических измерений, проведенных на пробах воды из Черного моря на спектрофотометре, лазерном спектрометре и флуориметре с импульсной модуляцией возбуждающего света. Получена линейная корреляция между интенсивностью поглощения хлорофилла в области 673 нм и интенсивностью флуоресценции хлорофилла (680–750 нм). На горизонтах ниже 20 м отмечено присутствие в составе фитопланктона фикозеритрин-содержащих форм. Приведены результаты недельного мониторинга обилия и функциональной активности фитопланктона в бухте Голубая по данным проточного флуориметра “Мега-25”.

DOI: 10.7868/S0030157417020083

ВВЕДЕНИЕ

Оценка пространственной и временной динамики фитопланктона является важнейшей задачей на пути к пониманию функционирования морских экосистем. Основным подходом к изучению фитопланктона по сей день остается батометрический отбор проб воды на различных горизонтах и их последующий лабораторный анализ. Особую роль в такой работе играют экспрессные оптические методы контроля, позволяющие получать первичную информацию о содержании и таксономическом составе фитопланктона на борту судна. По этим данным может быть скорректирована глубина взятия проб, а также проведен дополнительный внеплановый отбор проб в особых точках, обнаруженных на пути движения исследователя судна.

Оптические методы, адаптированные к условиям экспедиции, должны обладать достаточным запасом чувствительности и включать минимум подготовительных работ с пробой. К числу таких методов можно отнести определение флуоресценции хлорофилла [4, 5] и измерение спектров поглощения взвешенных в воде частиц на стекловолоконных фильтрах [8]. Сравнительно молодым методом в практике океанологических исследований является определение спектров флуоресценции фитопланктона и растворенного в воде органического вещества [1], регистрация ко-

торых стала возможной благодаря появлению малогабаритных спектрометров и мощных полупроводниковых источников света.

В настоящей работе мы провели анализ данных, полученных на одних и тех же пробах морской воды с помощью трех фотометрических приборов различного назначения — спектрофотометра, импульсно-модулированного флуориметра и лазерного спектрометра.

МЕТОДЫ

Отбор проб воды (более 30 шт.) проводили в июне 2014 г. в районе бухты Голубая Черного моря (рис. 1). Приблизительно половина проб была взята с поверхности (0 и 5 м), на некоторых станциях дополнительно взяты пробы с горизонтов 17–45 м.

Спектры поглощения были записаны в диапазоне 400–800 нм на портативном спектрофотометре, разработанном на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ. Пучок света источника (лампа накаливания) направлен в интегрирующую сферу ($d = 38$ мм) и проецируется на круглое отверстие ($d = 10$ мм) с ее противоположной стороны. В этом отверстии устанавливаются стекловолоконные фильтры с осажденными на них клетками фитопланктона. Фильтры прижимают к сфере снаружи при помощи диффузно

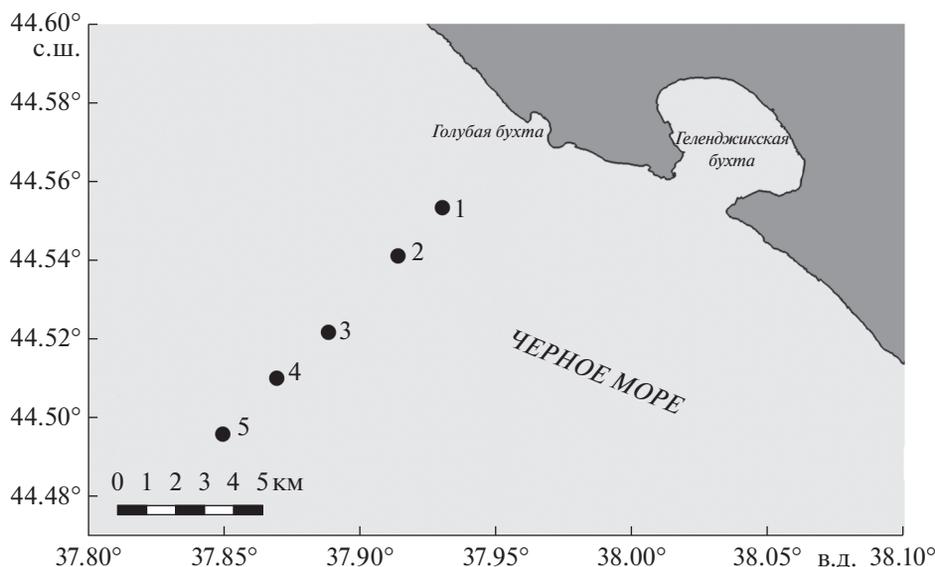


Рис. 1. Район отбора проб.

отражающей подложки (флуорилон). Из сферы излучение выводится на спектрометр USB2000+ (Ocean Optics, США). В описанной конфигурации интегрирующая сфера служит для сбора отраженного от объекта света. Нулевая линия прибора была записана по влажному чистому фильтру GF/F. Спектры отражения пересчитаны в спектры поглощения с предположением, что все потери света, фиксируемые детектором относительно нулевой линии, обусловлены поглощением света на его пути от передней поверхности фильтра до отражающей подложки и обратно во внутренний объем сферы.

Спектры флуоресценции хл «а» и растворенного органического вещества измерены на лазерном спектрометре ЛС-2. Прибор разработан в Лаборатории оптики океана ИО РАН и имеет 2 лазерных источника возбуждающего излучения с длинами волн $\lambda_1 = 401$ нм и $\lambda_2 = 532$ нм. Возбуждаемое лазерным пучком излучение флуоресценции и комбинационного рассеяния на молекулах воды собирается оптической системой, ось которой располагается ортогонально оптическим осям лазерных пучков. Для подавления рассеянного излучения на рабочей гармонике лазера, перед входной линзой оптической системы устанавливается стеклянный фильтр ЖС-11 толщиной 3 мм (для $\lambda_1 = 401$ нм), либо специальный дихроичный фильтр (для $\lambda_2 = 532$ нм). Принятое излучение по гибкому световоду FA2206 (Ocean Optics) поступает на вход спектрометра USB4000 (Ocean Optics, ширина входной щели 0.2 мм). Спектральный диапазон регистрации 200–850 нм.

Интенсивность флуоресценции хлорофилла в пробах воды была измерена на флуориметре «Мега-25» кафедры биофизики МГУ, подробно опи-

санном ранее [2]. Источник возбуждающего света ($\lambda_{\max} = 455$ нм) имеет импульсную модуляцию для определения флуоресценции при открытых (F_o) и закрытых (F_m) реакционных центрах фотосистемы 2. По F_o и F_m был рассчитан параметр $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ — относительная переменная флуоресценция хлорофилла, которая равна максимально возможному в данных условиях квантовому выходу первичных процессов фотосинтеза. Флуориметр «Мега-25» также работал в проточном режиме (7 дней в сентябре 2014 г) на причале Южного отделения Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН (б. Голубая). Глубина отбора воды — 1 м.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале июня 2014 г. фитопланктон был представлен типичными для данного сезона диатомовыми и динофитовыми водорослями, о чем свидетельствует характерное положение полос в спектре поглощения и соотношение высоты между ними (рис. 2а, горизонт 17 м). В то же время, на всех станциях, где были взяты дополнительные пробы ниже 20 метров, мы наблюдали появление фикозитрин-содержащих форм фитопланктона. Изменения в пигментном составе проб удобно рассмотреть на примере ст. 2, где были взяты пробы с горизонтов 0, 5, 17, 22, 33 и 45 м. Опустив переходные варианты, мы приводим здесь только два типичных спектра поглощения планктонных частиц — для «верхнего» (17 м) и для «нижнего» (45 м) горизонтов (рис. 2а). Пробы с «верхних» горизонтов (0, 5, 17 и 22 м) содержат в своем составе буро-окрашенную группу водорослей, к которой относятся практически неотличимые друг

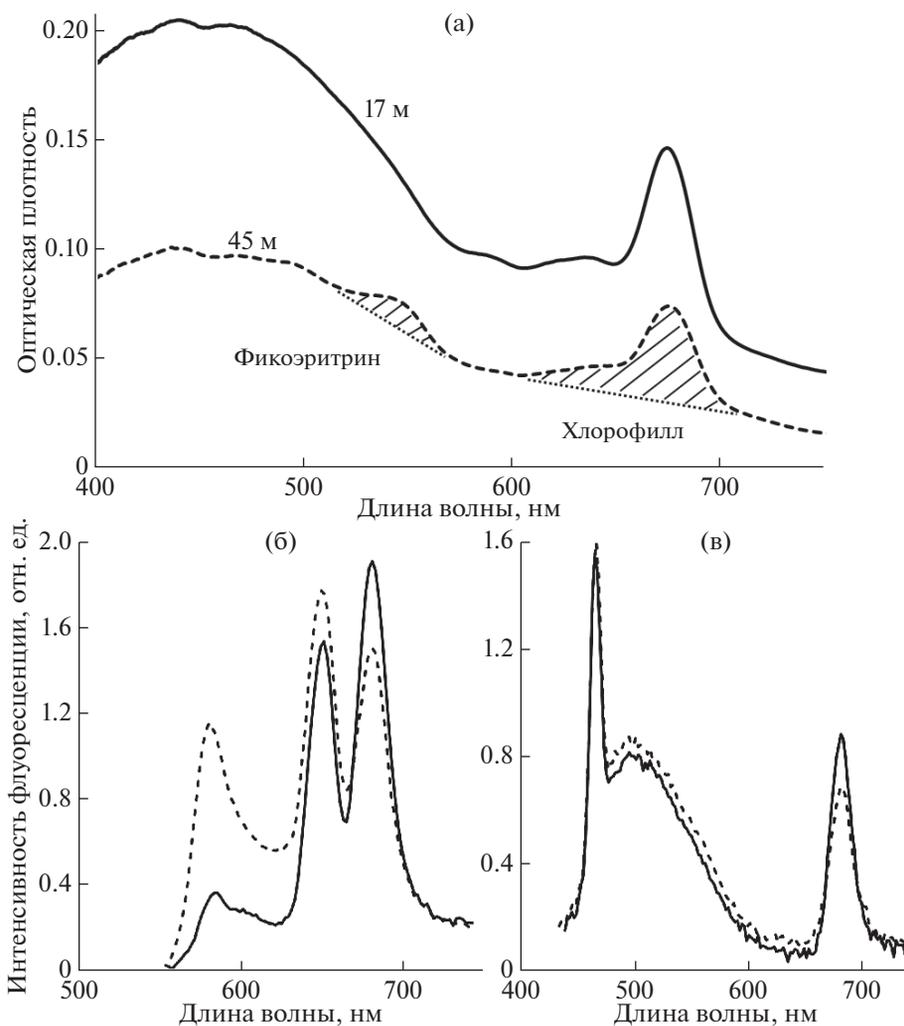


Рис. 2. Спектры поглощения и флуоресценции проб с “верхних” (сплошная линия) и “нижних” (пунктир) горизонтов. (а) – Спектры поглощения; (б) – спектры флуоресценции при возбуждении зеленым лазером (532 нм); (в) – спектры флуоресценции при возбуждении фиолетовым лазером (401 нм).

от друга по спектрам поглощения диатомеи и динофиты (кривая 17 м на рис. 2а). В области 420–460 нм сосредоточены коротковолновые полосы поглощения хлорофиллов “а” и “с” (полосы Со-ре). Поглощение в диапазоне 480–540 нм обусловлено каротиноидами фукоксантином и/или перидинином. В области 600–700 нм расположены длинноволновые полосы поглощения хл “а” и “с”.

В пробах с глубины 33 м и 45 м (кривая 45 м на рис. 2а) содержание хлорофилла уменьшается по сравнению с вышележащими горизонтами. При этом на спектре появляется дополнительная узкая полоса поглощения при 545 нм, характерная для фикоэритрин-содержащих цианобактерий, красных и криптофитовых водорослей. Фильтр с осажденными клетками имел в этих случаях четко различимый розовый оттенок.

Аналогичное качественное изменение в пигментном составе проб было обнаружено нами по спектрам флуоресценции (прибор ЛС-2). При

возбуждении флуоресценции зеленым лазером, на спектре испускания присутствует полоса комбинационного рассеяния рабочей гармоники лазера (650 нм), полоса флуоресценции хлорофилла (680 нм) и полоса флуоресценции фикоэритрина (560 нм), интенсивность которой увеличивается к горизонту 45 м (рис. 2б). Количественные оценки содержания фикоэритрина в пробах, сделанные независимо по спектрам ЛС-2 и по спектрам поглощения (площадь заштрихованной области на рис. 2а), плохо коррелировали друг с другом (данные не представлены). Однако как качественный метод обнаружения фикоэритрина, лазерная спектрометрия, безусловно, оказывается более удобной, так как не требует фильтрации пробы перед измерением. За счет наличия второго лазера (401 нм), прибор ЛС-2 подходит также для экспресс-оценки содержания растворенного органического вещества (рис. 2в).

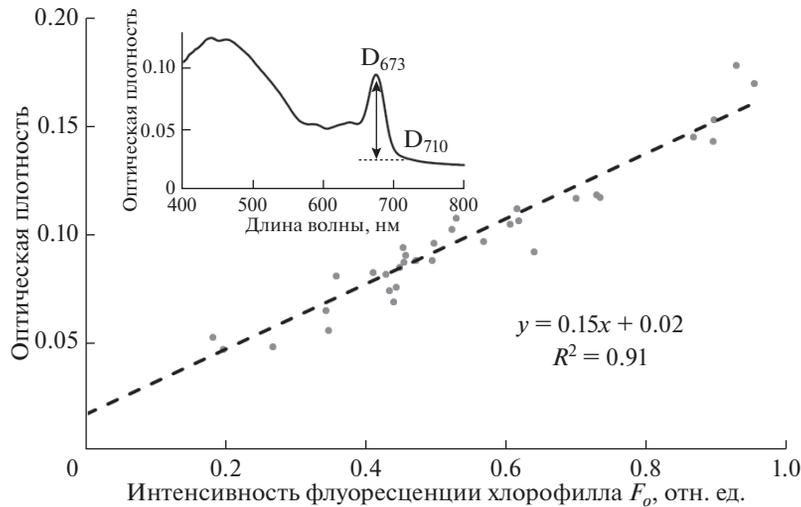


Рис. 3. Корреляция между интенсивностью флуоресценции хлорофилла и поглощением хлорофилла в пробах воды. Вставка в левом верхнем углу – оценка собственного поглощения хлорофилла на спектре, записанном в присутствии терригенных взвесей.

Корреляция между интенсивностью флуоресценции хлорофилла, определенной на флуориметре “Мега-25”, и величиной поглощения взвесей в области 673 нм, определенной спектрофотометрически на фильтрах GF/F, представлена на рис. 3. В исследованных пробах (более 30 шт.) интенсивность флуоресценции хлорофилла изменялась в 5 раз (рис. 3). В этом диапазоне обнаружена линейная связь между интенсивностью флуоресценции хлорофилла и величиной поглощения хлорофилла в полосе 673 нм (рис. 3). Высокий коэффициент корреляции ($R = 0.95$) свидетельствует о близком значении квантового выхода флуоресценции хлорофилла в разных пробах, что возможно при однородном таксономическом составе фитопланктона исследованной акватории.

Измерение параметров флуоресценции хлорофилла в проточном режиме (флуориметр “Мега-25”) позволило наблюдать динамику фитопланктона в прибрежной зоне (200 м, бухта Голубая). На рис. 4а представлено изменение в течение недели основных параметров – F_o и F_v/F_m . Изменение содержания фитопланктона в большую или меньшую сторону проявляется в пропорциональном изменении как F_o , так и F_m . Мы использовали в качестве показателя обилия фитопланктона уровень F_o . Из рис. 4а следует, что в одной точке акватории в течение суток содержание фитопланктона может варьироваться в 2 и более раз (по динамике F_o на интервале времени 0–1 сут.).

Лишь в один день экспедиции (период 6–7 суток, рис. 4а) количество фитопланктона (F_o) изменялось незначительно. Динамика параметров флуоресценции за этот день подробно развернута во времени на рис. 4б. В период от полуночи до 7 утра эффективность первичных процессов фо-

тосинтеза составляла около 0.5 (кривая F_v/F_m на рис. 4б). Такое значение F_v/F_m нельзя назвать высоким, так как для большинства водорослей в

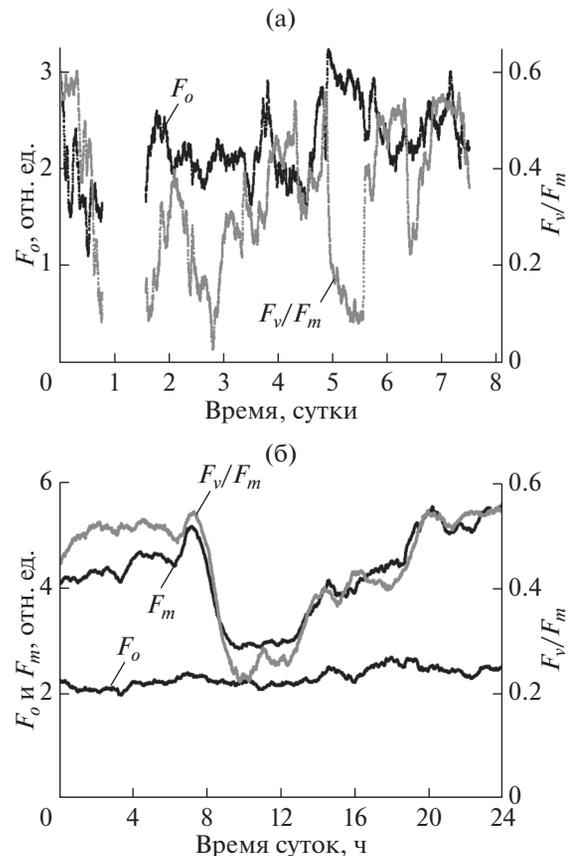


Рис. 4. Динамика параметров флуоресценции хлорофилла в бухте Голубая: (а) – в течение недели; (б) – в течение суток (интервал времени между отметками 6 и 7 на диаграмме (а)).

отсутствие дефицита минерального питания характерно значение F_v/F_m более 0.65. Известно также, что при $F_v/F_m < 0.3$ лабораторные культуры водорослей прекращают наращивать численность [7]. Поэтому полученные значения F_v/F_m свидетельствуют об умеренном дефиците минерального питания в период наблюдений.

После 8 часов утра происходит довольно быстрое снижение эффективности процессов фотосинтеза в 2 раза (F_v/F_m уменьшается от 0.5 до 0.25, рис. 4б). Причиной такого снижения является нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла [3, 6], о чем говорит снижение параметра F_m . После захода Солнца процессы нефотохимического тушения в клетках водорослей релаксируют. При этом интенсивность максимальной флуоресценции увеличивается (кривая F_m на рис. 4б), и эффективность фотосинтеза возвращается к исходному уровню 0.5 (кривая F_v/F_m , рис. 4б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование говорит о неоднородном распределении фитопланктона в пространстве и о быстром изменении обилия планктонных водорослей даже в пределах относительно небольшой акватории. В таких условиях количество фитопланктона в одной точке может неоднократно возрастать и убывать в течение суток (рис. 4а), поэтому адекватно оценить содержание микроводорослей можно только экспресс-методами по интенсивности флуоресценции проб (хлорофилла и фикобилинов). Для корректного определения содержания хлорофилла в абсолютных единицах, флуориметр должен быть откалиброван *in situ* по пробам морской воды (рис. 3).

В пробах воды, содержащих фикоэритрин, показано качественное соответствие между данными лазерного спектрометра (интенсивность флуоресценции в области 560 нм) и показаниями

спектрофотометра (интенсивность поглощения в области 545 нм). По оперативности работы в условиях экспедиции лазерная спектрометрия существенно превосходит абсорбционные измерения на фильтрах.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-17-00800), предоставленного через Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гольдин Ю.А., Шатравин А.В., Левченко В.А. и др. Исследование пространственной изменчивости интенсивности флуоресценции морской воды в западной части черного моря // *Фундаментальная и прикладная гидрофизика*. 2015. Т.7. № 1. С. 17–26.
2. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В. и др. Применение флуориметра “МЕГА-25” для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // *Вода: Химия и экология*. 2009. №6. С. 34–40.
3. Crofts A., Yerkes C.T. Molecular Mechanism for qE-quenching // *FEBS Lett*. 1994. V. 352. P. 265–270.
4. Kolber Z., Falkowski P.G. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ // *Limnology and Oceanography*. 1993. V. 38. № 8. P. 1646–1665.
5. Konyukhov I., Pogosyan S., Selina M. et al Experience of continuous fluorimetric monitoring of phytoplankton at a mooring station // *Oceanology*. 2012. V. 52. № 1. P. 130–140.
6. Muller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiology*. 2001. V. 125. № 4. P. 1558–1566.
7. Voronova E. N., Il'ash L. V., Pogosyan S. I. et al In-trapopulation heterogeneity of the fluorescence parameters of the marine plankton alga *Thalassiosira weissflogii* at various nitrogen levels // *Microbiology*. 2009. V. 78. № 4. P. 419–427.
8. Yentsch C.S. Measurement of visible light absorption by particulate matter in the Ocean // *Limnology and Oceanography*. 1962. V. 7. № 2. P. 207–217.

Complex of the Optical Methods for Marine Phytoplankton Studying

I. V. Konyukhov, D. I. Glukhovets

The results of the joint optical measurements are studied via the analyses of water samples from the Black sea with the spectrophotometer, laser spectrometer and fluorimeter with a pulsed modulation of the excitation light. A linear correlation is found between the intensity of the absorption by chlorophyll at 673 nm and the intensity of chlorophyll fluorescence (680–750 nm). At the horizons below 20 m the presence of phycoerythrin-containing forms in a phytoplankton composition is noted. The results of weekly monitoring of the abundance and functional activity of phytoplankton in the Golubaya Bay are shown according to the flow-through fluorimeter “Mega-25”.