

**СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ
ПОСЛЕ СЛАБЫХ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ**

© 2018 г. Н. Ю. Григорьева¹, *, Л. В. Чистякова², А. А. Лисс¹

¹Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет “ЛЭТИ”,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: renes3@mail.ru

Поступила в редакцию 02.02.2017 г.

После доработки 13.06.2017 г.

Цианобактериальное “цветение” открытых водоемов и приустных территорий — одна из важнейших экологических проблем современности. Наиболее оптимальный способ ее решения — это разработка методов контроля численности цианобактерий, основанных на применении слабых внешних воздействий, не оказывающих негативного влияния на экосистему в целом. Для оперативного мониторинга результатов слабых внешних воздействий нами разработана эффективная методика определения физиологического состояния цианобактерий *in vivo* с использованием различных методов спектрального анализа. Показано, что существует строгая корреляция между результатами, полученными с использованием традиционных методов спектрофотометрии и флуориметрии, применяемых к культурам в целом, и данными новейших методов флуоресцентной микроспектроскопии отдельных клеток.

DOI: 10.1134/S0030157418060060

ВВЕДЕНИЕ

Проблема борьбы с цианобактериальным “цветением” является крайне важной и весьма актуальной не только в России, но и за рубежом [1, 8, 16, 30]. В настоящее время наряду с уже имеющимися химическими и бактериологическими методами, разрабатываются более экологичные методы борьбы с цианобактериальным “цветением” водоемов, например, применение слабого ультразвукового воздействия [7, 11, 15, 25, 32]. Эти методы основаны преимущественно на подавлении размножения цианобактерий, и не должны оказывать повреждающего воздействия на экосистему в целом.

Однако методики исследования и мониторинга результатов различных воздействий на цианобактерии слабо отработаны [15, 24, 25, 32]. В связи с этим возникает необходимость разработки соответствующей неразрушающей методики определения физиологического состояния цианобактерий после слабых внешних воздействий, которые приводят не к мгновенной гибели от-

дельных клеток, а лишь к изменению их физиологического состояния.

На данный момент не вызывает сомнения то, что анализ спектральных характеристик светособирающих комплексов представляет собой мощный инструмент изучения воздействия самых разнообразных экологических факторов на фотосинтезирующие организмы [5, 6]. Различные спектроскопические методики, основанные на анализе спектров поглощения и флуоресценции хлорофиллов, активно применяются для выявления повреждающих воздействий на клетки водорослей и высших растений [13, 14, 17, 19, 26, 29]. Традиционно, для этих целей используют интегральные спектры поглощения и флуоресценции фотосинтетических пигментов, в первую очередь — хлорофиллов *a* и *b*. Однако, интегральные спектры не способны отразить слабые изменения в состоянии фотосинтетического аппарата клеток, поскольку формируются как среднее для множества клеток в различном физиологическом состоянии. Кроме того, вклад в интегральный спектр

могут вносить и различные флуоресцирующие компоненты, присутствующие в культуральной среде. С другой стороны, для исследования цианобактерий все методики, разработанные для высших растений, обязательно должны быть модифицированы, с учетом уникальных особенностей строения фотосинтетического аппарата этих организмов.

В ходе экспериментальных исследований было показано, что достаточно эффективным методом для выявления слабых неразрушающих воздействий на фотосинтетический аппарат цианобактерий является анализ спектров одиночных клеток, полученных методами конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). В настоящей работе представлены результаты исследования цианобактерий рода *Synechocystis* штамма 1336 из коллекции CALU различными спектроскопическими методами. В частности, исследованы клетки в различных физиологических состояниях, взятые из исходной культуры и из культуры после применения внешних воздействий. По результатам сравнительного анализа полученных данных, предложена методика определения физиологического состояния цианобактерий *in vivo*, основанная на строгой зависимости спектров собственной флуоресценции отдельных клеток и культуры в целом от общего физиологического состояния.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые штаммы цианобактерий и условия культивирования. В исследовании были использованы цианобактерии рода *Synechocystis*, штамм 1336 коллекции CALU. Все работы по подготовке культур цианобактерий для исследования проводили на базе Ресурсного центра “Культивирование микроорганизмов” Научного парка Санкт-Петербургского Государственного университета. В коллекции CALU штаммы цианобактерий поддерживают в полужидкой агаризованной (0.8%) среде № 6 Громова [2] в пробирках под ватными пробками, объем среды 5–6 мл. Штаммы хранятся при 14°C и постоянном освещении 2000 люкс, пересев осуществляется с периодичностью 2–3 мес. Цианобактерии, используемые в эксперименте, выращиваются на жидкой среде № 6. Предварительно готовят стоковую культуру, для чего производят посев в 30 мл среды и инкубируют в течение 2 недель при комнатной температуре и непрерывном освещении люминесцентными лампами. Для получения рабочей культуры 2 мл стока добавляют к 30 мл среды, инкубируют в течение недели при комнатной температуре и постоянном освещении белыми флуоресцентными лампами.

Для сохранения постоянного объема раз в две недели в стоковую культуру добавляют 5 мл среды. Все эксперименты в ходе данного исследования проводились с культурами предположительно в логарифмической фазе развития.

Спектрофотометрия и флуориметрия. Стандартные методы спектрофотометрического и флуоресцентного анализа давно известны и широко применяются как в биоокеанологии [3], так и при исследовании внутренних водоемов [6]. В данной работе для исследования спектров поглощения цианобактериальных культур использовался спектрофотометр GENESYS 10S UV-Vis, а для исследования спектров собственной флуоресценции – сканирующий флуориметр Cary Eclipse (Varian Cary). Измерения проводились при комнатной температуре и постоянном помешивании. Суспензия живых клеток помещалась в стандартную кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. При снятии спектров на спектрофотометре в качестве базовой линии выбирался спектр культуральной среды. Спектры поглощения снимались в диапазоне 300–1100 нм с шагом 1 нм. Спектры флуоресценции снимались в диапазоне 560–800 нм при длинах волн возбуждающего излучения 390, 405, 458, 476, 488, 496, 633 нм, что соответствует основным лазерным линиям конфокального микроскопа. Ширина полосы пропускания монохроматоров (для возбуждения и эмиссии) устанавливалась 5 нм.

Для удобства сравнения результатов флуоресцентного анализа экспериментальные и контрольные спектры, снятые при возбуждении разными длинами волн, нормировались на максимум и представлялись на одном графике в виде серии сдвинутых по горизонтальной оси кривых.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Для проведения спектроскопических исследований отдельных клеток цианобактерий использовался конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Leica TCS-SP5, оснащенный тремя лазерами: диодный лазер (405 нм), аргоновый лазер (458, 476, 488, 496, 514 нм), гелий-неоновый лазер (543, 633 нм). Спектры флуоресценции в диапазоне 560–785 нм снимались с помощью стандартной операции лямбда-сканирования программного обеспечения ‘Leica Confocal Software’. Серия из 38 пространственных распределений интенсивности флуоресценции с размером 512 × 512 пикселей снималась при полосе пропускания 6 нм и с шагом 6 нм. Одновременно с регистрацией распределений интенсивности флуоресценции делали фотографии клеток в режиме светлого поля. В качестве объектива использовался иммерсионный

объектив с апертурой 1.3 (объектив HCX PL APO 63.0 × 1.30 GLYC 37°C UV) с глицериновой иммерсией (глицерин 80% H₂O). Размер 1 пикселя изображения соответствует 53.5 × 53.5 нм. При обработке спектров флуоресценции использовалось графическое усреднение по так называемой “области интереса” (ROI), охватывающей отдельную клетку [18, 22, 31, 33].

Очевидно, что из-за узкой локализации лазерного луча и высокой мощности возбуждающего излучения достаточно высока вероятность повреждения живой клетки во время ламбда-сканирования. Поэтому, нами предварительно были исследованы различные режимы снятия спектров при возбуждении разными лазерами и выбран режим наименее повреждающий клетку с ориентировочной интенсивностью светового потока на объекте 11 000 мкмоль фотон/м² с.

Кроме того, для определения степени повреждения клетки при конкретной мощности лазерной линии проводилось измерение серии из десяти одинаковых спектров (например, при возбуждении лазерной линией 488 нм). При этом фиксировалось изменение интенсивности и формы спектра. Если изменение площади под кривой для последнего спектра в серии не превышала 10%, то результат считался удовлетворительным.

При проведении экспериментальных исследований усреднение проводилось в среднем по 10–30 клеткам в зависимости от вида исследований. Для получения полного набора спектров при возбуждении разными лазерными линиями отрабатывалось 5–10 клеток. Для получения результатов после внешних воздействий статистическая обработка проводилась по 15–30 клеткам. В каждом случае в математическом пакете STATISTICA 10 определялось среднее значение и доверительный интервал в каждой точке спектра.

Для удобства сравнения результатов флуоресцентного анализа усредненные экспериментальные и контрольные спектры, снятые при возбуждении разными лазерными линиями, нормировались на максимум и представлялись на одном графике в виде серии сдвинутых по горизонтальной оси кривых.

Импульсная модуляционная спектрофлуориметрия. Параметры фотосинтетической активности, отражающие физиологическое состояние исследуемой культуры, регистрировались импульсным спектрофлуориметром PAM 2500 (WALZ, Германия) по методу световых кривых [5, 21, 27]. Флуоресценция цианобактериальных клеток возбуждалась серией из 12 двухсекундных насыщающих импульсов красного света интенсивностью

10 ммоль м⁻² с⁻¹ (630 нм), которые следовали с 30 секундным перерывом, на фоне усиливающегося от 0 до 800 мкмоль м⁻² с⁻¹ синего актиничного света с длиной волны 455 нм. Флуоресцентный отклик фиксировался на длинах волн выше 700 нм. Перед каждым измерением суспензия клеток оставалась в темноте около 1 минуты для темновой адаптации. Измерялась зависимость максимальной квантовой эффективности ФСII (Fv/Fm), скорости электронного транспорта (ETR), фотохимического превращения энергии или квантового выхода ФСII (Y(II)), регулируемого рассеяния тепловой энергии (фотопротекторные механизмы) (Y(NPQ)) и потерь энергии на флуоресцентное излучение (Y(NO)) от уровня фотосинтетически активной радиации (PAR) при синем актиничном свете. Измерения проводились при комнатной температуре с использованием специальной кюветы для жидких образцов с магнитной мешалкой. Конечные кривые получались путем усреднения по 10 независимым экспериментам. Все количественные параметры флуоресценции и связанные с ней вторичные показатели вычисляли в штатной программе прибора PamWin V3.20w4.

Для получения окончательных результатов проводилась статистическая обработка по 10 повторностям. В каждой точке определялось среднее значение и доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование цианобактерий в исходном (нативном) состоянии. На первом этапе исследований в культуре цианобактерий были выявлены клетки, отчетливо различающиеся по своим спектрам флуоресценции. Анализ полученных спектров показал, что они полностью совпадают с качественным описанием флуоресценции синезеленых водорослей в различных физиологических состояниях, данным в работах С.В. Горюновой в 1953–1956 гг. (см. ссылки в [6]). Метод Горюновой был основан на том, что при микроскопировании синезеленых водорослей в ультрафиолетовых лучах клетки, различающиеся по своему физиологическому состоянию, дают различные по окраске и яркости оттенки свечения. Таким образом, различия в спектрах флуоресценции, видимо, отражают различия в физиологическом состоянии отдельных клеток цианобактерий. Современные методы исследования позволяют делать не только качественный, но и количественный анализ спектров собственной флуоресценции цианобактерий, и точно фиксировать смещение длины волны и интенсивности

отдельных пиков в зависимости от изменения физиологического состояния клеток.

Мы предположили, что для дальнейшего анализа физиологического состояния культуры в целом достаточно рассматривать три основных промежуточных состояния, представленные на рис. 1а: I – клетка в нормальном физиологическом состоянии, II – клетка, в которой произошли необратимые изменения – разрушающаяся клетка, III – мертвая клетка. Первые два состояния предположительно дают основной вклад в спектры флуоресценции цианобактериальной культуры, получаемые на стандартном флуориметре. Для подтверждения данной гипотезы было проведено сравнение спектров отдельных клеток с конфокального микроскопа со спектрами культуры, полученными на сканирующем флуориметре.

Согласно выбранным спектрам клетки, соответствующим основным физиологическим состояниям для исследуемой культуры *Synechocystis CALU 1336* (рис. 1а), на конфокальном микроскопе были сняты и обработаны по выборке серии спектров флуоресценции клеток в нормальном и угнетенном физиологическом состоянии при возбуждении всеми лазерными линиями, и составлены базовые наборы для двух основных физиологических состояний “здоровая клетка” и “клетка в сильно угнетенном, разрушающемся состоянии” (см. рис. 1б, жирные линии – здоровая клетка, тонкие линии – клетка в угнетенном состоянии).

Сравнивая усредненные спектры флуоресценции отдельных клеток со спектрами флуоресценции культуры в целом (рис. 1в, жирные линии) видим, что ни одна серия спектров рис. 1б, в отдельности не описывает интегральный спектр. Однако, если сложить базовые спектры (рис. 1б) с учетом их относительной интенсивности, то получим полное совпадение спектров, снятых с отдельных клеток и исследуемой культуры (рис. 1в, тонкие линии). В данном случае соотношение здоровых и угнетенных клеток получилось 2 : 1. При таком соотношении культуру можно считать достаточно жизнеспособной.

Из приведенного примера следует, что степень повреждения культуры цианобактерий определяется относительной интенсивностью флуоресценции фикобилинов (в данном случае на длине волны 656 нм) и хлорофилл-белковых комплексов (на длине волны 682 нм), причем, наиболее ярко это соотношение проявляется при длинах волн возбуждения 476, 488 и 496 нм, где максимумы эмиссии 656 и 682 нм для здоровых и угнетенных клеток меняются местами. Это является следствием того, что длины волн 405 и 658 нм на-

прямую возбуждают хлорофилл-белковые комплексы фотосинтетической системы, а длины волн 514, 543 и 633 нм возбуждают в основном флуоресценцию пигментов антенного комплекса. Длины волн 476, 488 и 496 нм в данном случае являются промежуточными и одинаково возбуждают и хлорофиллы, и фикобилины.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод, что, имея полный статистически достоверный набор спектров клеток определенного таксона цианобактерий в различных физиологических состояниях, можно выделить в исследуемой пробе группы клеток в интересующих физиологических состояниях, дающих максимальный вклад в интегральный спектр, и, усреднив их спектры по достаточному количеству измерений, использовать их в качестве базиса при разложении интегральных спектров исследуемой культуры. Такой метод даст приблизительную количественную оценку физиологического состояния культуры в целом (то есть соотношение живых и угнетенных клеток). С другой стороны, анализ небольшой выборки цианобактерий из природной популяции с использованием спектров флуоресценции индивидуальных клеток, также позволит оценить их физиологическое состояние при сравнении с имеющейся библиотекой спектров для данного таксона.

Исследование светового разрушения клеток.

Для составления библиотеки спектров клеток цианобактерий конкретной систематической принадлежности в различных физиологических состояниях (связанных с состоянием фотосинтетического аппарата), в качестве модельного повреждающего воздействия было выбрано световое разрушение клеток цианобактерий под действием лазерного луча. Световой пучок в качестве повреждающего агента был выбран потому, что он оказывает непосредственное влияние на фотосинтетический аппарат клетки.

Спектры флуоресценции цианобактериальных клеток *Synechocystis CALU 1336* в различных физиологических состояниях, представленные на рис. 2, были получены путем светового разрушения на конфокальном микроскопе Leica TCS-SP5. Для этого была выбрана наиболее информативная, с точки зрения количества возбуждаемых пигментов, линия аргонового лазера с длиной волны 488 нм. В течение 40 мин выбранная клетка облучалась заведомо повреждающим излучением лазера конфокального микроскопа (zoom 15%, доля линии 488 нм 20%) и каждую минуту снимался спектр флуоресценции в диапазоне 560–785 нм. На рис. 2 представлена серия спектров флуоресценции с временным шагом

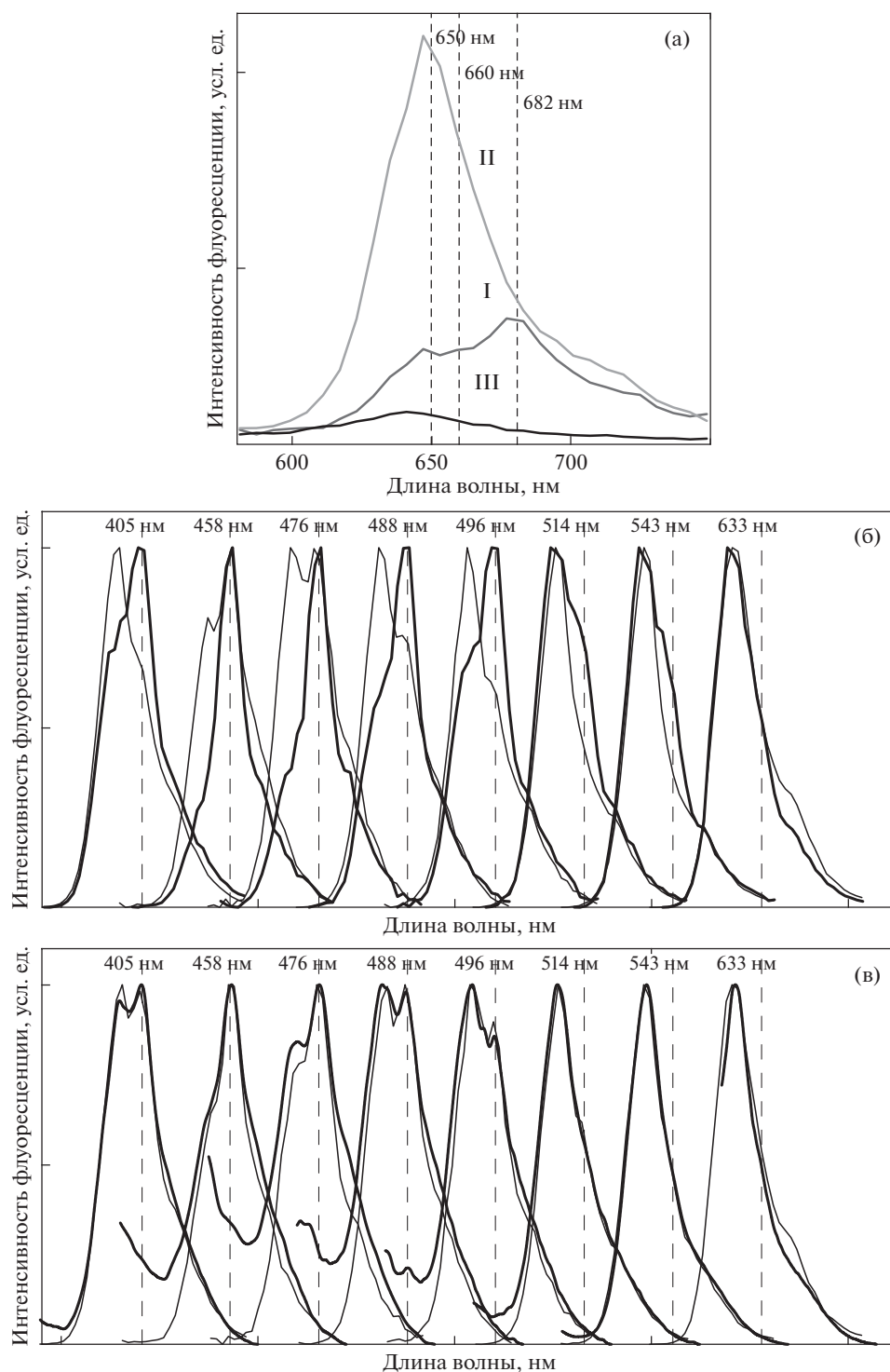


Рис. 1. Спектры собственной флуоресценции штамма *Synechocystis CALU 1336*. (а) – Спектры, полученные при возбуждении на 488 нм и соответствующие трем основным физиологическим состояниям клеток в исследуемой культуре, (б) – базовые наборы спектров для клеток исследуемого штамма цианобактерий в двух физиологических состояниях. Жирные линии – здоровая клетка, тонкие линии – клетка в угнетенном физиологическом состоянии. (в) – Сравнение спектров собственной флуоресценции цианобактерий, полученных разными методами. Жирные линии – интегральные спектры для культуры в целом, полученные с флуориметра; тонкие линии – суммарные спектры с конфокального микроскопа.

На рисунках (б) и (в) каждая пара спектров сдвинута по горизонтальной оси на 90 нм относительно соседней для удобства сравнения. Цифры над кривыми указывают длину волны возбуждающего лазера. Пунктирные линии отмечают положение максимума флуоресценции хлорофилл-белковых комплексов (682 нм).

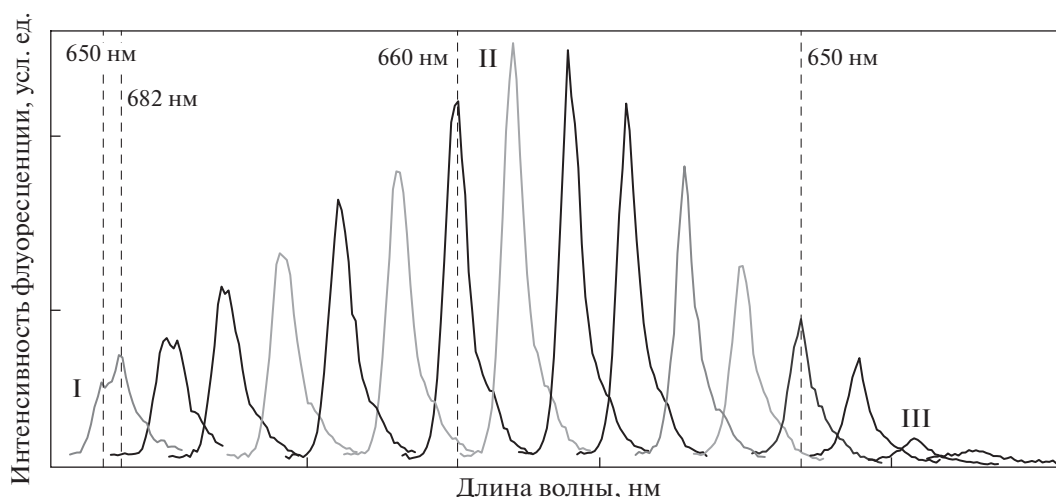


Рис. 2. Последовательное изменение спектра флуоресценции цианобактериальной клетки *Synechocystis CALU 1336* при световом разрушении. Параметры повреждающего излучения: линия аргонового лазера с длиной волны 488 нм на 20%, zoom 15%. Облучение в течение 40 мин. Для удобства спектры, снятые через каждые 3 минуты, сдвинуты друг относительно друга на 100 нм по горизонтальной оси.

3 мин. Для удобства представления информации спектры, снятые в разные моменты времени, сдвинуты друг относительно друга на 100 нм по горизонтальной оси. Для ориентировки пунктирными линиями на графике отмечены длины волн нескольких характерных максимумов флуоресценции.

Очевидно, что стадии ухудшения физиологического состояния клетки цианобактерии, представленные на рис. 2, полностью совпадают с данными, полученными на первом этапе нашего исследования для клеток исходной цианобактериальной культуры (рис. 1а).

Исследование культуры цианобактерий после слабого ультразвукового воздействия. Для проверки адекватности использования полученной нами библиотеки спектров для оценки слабых повреждающих воздействий на культуру цианобактерий, было проведено исследование результатов воздействия слабого ультразвукового облучения на культуру *Synechocystis CALU 1336* с использованием всех доступных нам спектроскопических методов — спектрофотометрии, флуориметрии, КЛСМ и импульсной модуляционной спектрофлуориметрии.

На рисунках 3–5 представлены результаты исследования цианобактериальной культуры *Synechocystis CALU 1336* после слабого ультразвукового облучения, проведенного по предложенной нами методике. Изначально суспензия живых клеток цианобактерий была разделена на три части и в течение трех дней развивалась в одинако-

вых условиях освещенности и температуры. При этом, экспериментальная часть культуры подвергалась воздействию ультразвукового излучения с частотой 60 кГц и мощностью 5.85 мВт/мл (в экспериментальном объеме).

На рис. 3 представлены спектры собственной флуоресценции живых клеток цианобактерий, снятые на Leica TCS-SP5 при возбуждении двумя разными лазерными линиями 488 нм (рис. 3а) и 543 нм (рис. 3 б) в диапазоне 590–785 нм и усредненные по 15 клеткам для получения каждого результирующего спектра. Тонкими линиями показаны спектры для контрольной части культуры, жирными — для экспериментальной. На рис. 4 приведены две серии спектров собственной флуоресценции для контрольной и экспериментальной части культуры, полученные на сканирующем флуориметре Cary Eclipse (тонкие линии — контроль, жирные — эксперимент). В обоих случаях усиление флуоресценции в экспериментальной группе свидетельствует о нарушениях в работе фотосинтетического аппарата, вызванных угнетенным физиологическим состоянием цианобактерий при наличии ультразвукового воздействия. В дополнение к проведенным исследованиям методами импульсной спектрофлуориметрии были получены параметры фотосинтетической активности для контрольной (тонкие линии) и экспериментальной культур (жирные линии) (рис. 5). Усреднение в данном случае проводилось по 10 повторностям. Эти исследования подтверди-

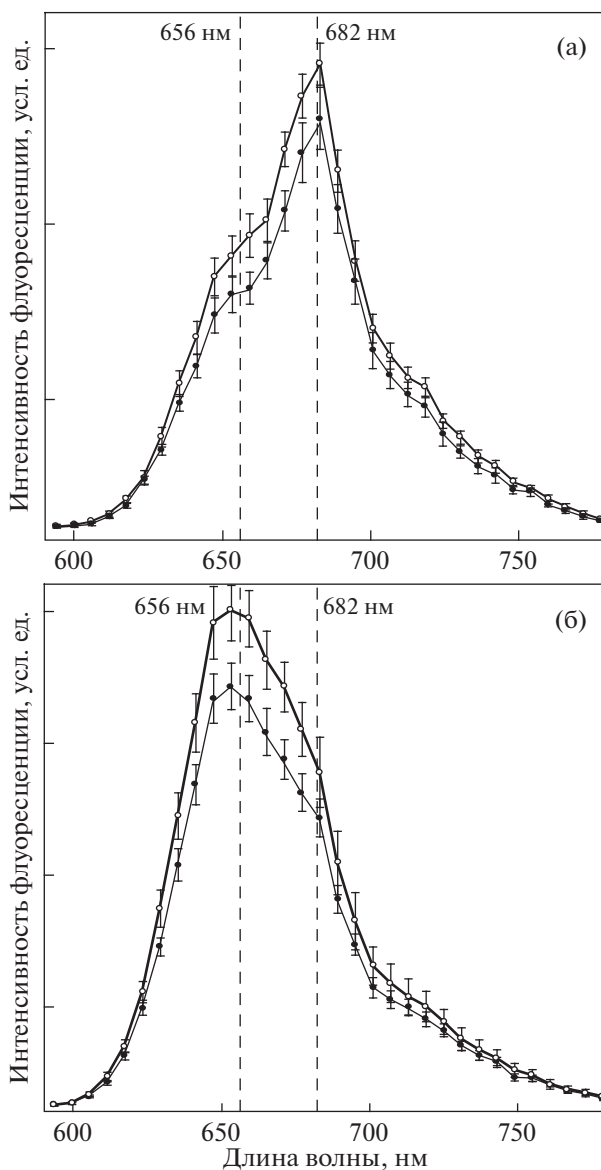


Рис. 3. Спектры собственной флуоресценции клеток цианобактерий *Synechocystis CALU 1336*, полученные при возбуждении двумя лазерными линиями 488 нм (а) и 543 нм (б) конфокального микроскопа. Жирные линии – облученная ультразвуком культура, тонкие линии – контрольная культура. Для получения каждого спектра проводилось усреднение по 15 клеткам.

ли сделанный ранее вывод об угнетающем воздействии слабого ультразвукового излучения. Таким образом, все три применяемых флуоресцентных метода показали идентичные результаты.

Данный эксперимент повторялся 4 раза в разные дни и с культурами *Synechocystis CALU 1336* в разных стадиях развития. Полученные результаты были аналогичны вышеизложенным.

Методика определения физиологического состояния цианобактерий после слабых внешних воз-

действий. Предлагаемая в данной работе методика основана на том, что при прочих равных условиях изменения в спектре флуоресценции живых клеток напрямую связаны с нарушениями в работе фотосинтетической цепи, которые, в свою очередь, могут быть следствием нарушений функционирования других клеточных структур при реакции на внешнее воздействие [5, 9, 10, 12, 20, 23]. С помощью данного экспресс-метода невозможно указать причину изменений физиологического состояния отдельных клеток и культуры в це-

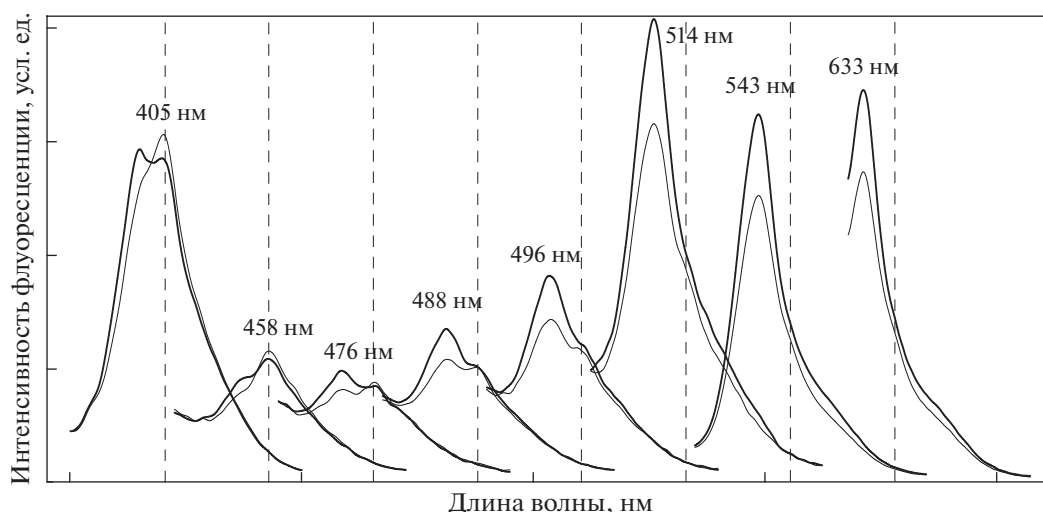


Рис. 4. Серии спектров собственной флуоресценции культуры цианобактерий *Synechocystis CALU 1336*, снятые с помощью флуориметра: жирные линии — облученная ультразвуком культура, тонкие линии — контрольная культура. Каждая пара спектров сдвинута по горизонтальной оси на 90 нм относительно соседней для удобства сравнения. Цифры над кривыми указывают длину волны возбуждающего света. Пунктирные линии отмечают положение максимума флуоресценции хлорофилл-присоединенных комплексов (682 нм).

лом, однако, можно точно определить, сравнивая спектры контрольной и экспериментальной групп, что такие изменения есть и оценить положительный или отрицательный эффект оказывают внешние воздействия на исследуемый штамм цианобактерий. В первую очередь методика предназначена для оценки последствий экспериментальных воздействий на цианобактерии в лабораторных условиях.

В рамках предлагаемой методики оценки физиологического состояния цианобактериальных культур основным измеряемым параметром является спектр собственной флуоресценции отдельных клеток. В качестве базового спектрального метода для проведения экспресс-мониторинга предлагается использовать конфокальную микроспектроскопию, как наиболее эффективный метод при исследовании *in vivo* отдельных клеток в натуральных и лабораторных пробах. При достаточных объемах исследуемого материала этот метод может быть дополнен стандартными средствами спектроскопии и флуориметрии, а для получения более полной и разносторонней информации об объекте анализ можно расширить за счет исследований кинетики процесса фотосинтеза методами импульсной модуляционной флуориметрии.

На первом этапе исследуется исходная цианобактериальная культура. На конфокальном микроскопе в ламбда-режиме снимаются нативные спектры отдельных клеток исходной культу-

ры при возбуждении всеми доступными лазерными линиями, для определения полного набора флуоресцирующих пигментов, а также спектры клеток на разных стадиях светового разрушения. Таким образом, создается библиотека спектров сравнения.

При необходимости, для лабораторных проб достаточного объема на спектрофотометре и флуориметре снимаются интегральные нативные спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения исходной культуры. Принципиально важно, чтобы исходная культура перед началом эксперимента была в хорошем физиологическом состоянии, иначе результат воздействия не удастся зафиксировать.

На втором этапе на конфокальном микроскопе в ламбда-режиме снимаются нативные спектры отдельных клеток контрольной и экспериментальной пробы. Для статистической надежности получаемых результатов выборка должна составлять 20–40 клеток в каждом физиологическом состоянии. Для сокращения времени проведения измерений можно ограничиться применением нескольких наиболее информативных и наименее повреждающих клетки лазерных линий. В проводимых нами исследованиях это были лазерные линии 488 нм (аргоновый лазер) и 543 нм (гелий-неоновый лазер). Выбор линии 488 нм, обусловлен тем, что синим светом одинаково хорошо возбуждается флуоресценция всех интересующих нас пигментов — фикобилинов и

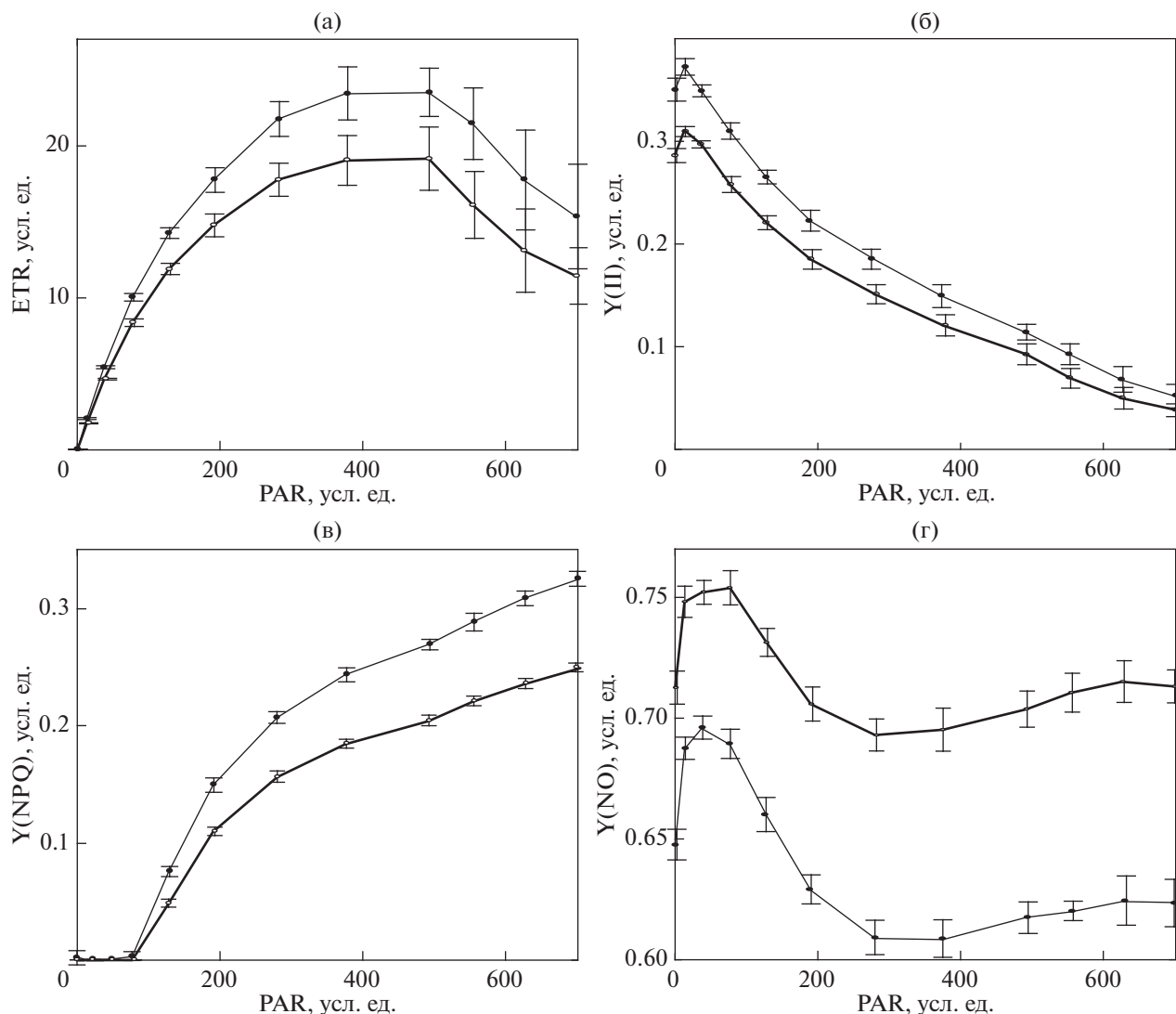


Рис. 5. Зависимость (а) – скорости электронного транспорта (ETR), (б) – квантового выхода фотосистемы ФСII ($Y(II)$), (в) – регулируемого рассеяния тепловой энергии ($Y(NPQ)$), (г) – потерь энергии на флуоресцентное излучение ($Y(NO)$) от уровня фотосинтетически активной радиации (PAR). Жирные линии – облученная ультразвуком культура, тонкие линии – контрольная культура.

хлорофиллов. Линия 543 нм была выбрана, как наиболее близкая к максимуму возбуждения фикоцианина, основного пигмента антенного комплекса *Synechocystis* sp. CALU 1336, и при этом наименее повреждающая клетку.

На основании полученных на этапе 1 и 2 данных проводится сравнительный анализ спектров собственной флуоресценции контрольной и экспериментальной культур с базовым набором спектров исходной культуры для оценки изменений в физиологическом состоянии как отдельных клеток, так и культуры в целом. Из результатов, полученных на конфокальном микроскопе для контрольной и экспериментальной проб выделяются спектры клеток в удовлетворительном фи-

зиологическом состоянии и усредняются по выборке из 20–40 клеток. Проводится сравнение амплитуды и формы соответствующих спектров для контрольной и экспериментальной групп. Показателем ухудшения физиологического состояния клеток служит усиление флуоресценции пигментов антенного комплекса.

В случае, если были получены интегральные спектры для исходной культуры и культуры после экспериментального воздействия, путем их сопоставления с усредненными спектрами, полученными при помощи КЛСМ, в культуре определяется процентное соотношение клеток в различных физиологических состояниях.

Следует отметить, что предложенная методика определения физиологического состояния цианобактериальных культур после слабых внешних воздействий не работает со старыми и мертвыми культурами. Интегральные спектры флуоресценции поврежденных или загрязненных культур при возбуждении разными длинами волн практически не отличаются друг от друга. Количество мертвых и диссоциированных клеток в них настолько велико, что разные длины волн одновременно возбуждают флуоресценцию всех светоактивных компонентов фотосинтетического аппарата. В этом случае, спектры культуры при возбуждении различными длинами волн имеют почти одинаковую форму: острый пик в области пигментов антенного комплекса, на который накладывается сильно размазанный пик хлорофилл-белковых комплексов ФСII и ФСI. В таких культурах исследовать влияние слабых внешних воздействий на физиологическое состояние культуры предлагаемым нами методом не представляется возможным.

Несмотря на то, что проведенный анализ является качественным, точность и устойчивость данного метода обеспечивается тем, что анализ проводится сразу по серии из нескольких спектров. Очевидно, что при описании одного интегрального спектра с помощью суперпозиции спектров отдельных клеток были бы возможны различные варианты, однако, при подборе коэффициентов разложения одновременно для восьми спектров результат будет однозначным и достоверным. Таким образом, для каждой отдельной культуры в данный момент времени может быть определено процентное содержание “здоровых” и “угнетенных” клеток, что и является в итоге показателем ее жизнеспособности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из приведенных выше результатов очевидно, что изменения физиологического состояния клетки, происходящие при ее повреждении различными внешними воздействиями, по крайней мере в ряде случаев отражаются в соответствующих изменениях спектра собственной флуоресценции отдельных пигментов. Имея для определенного штамма цианобактерий базовый набор спектров клетки в различных физиологических состояниях можно в дальнейшем анализировать культуру, выявляя даже незначительные нарушения в работе фотосинтетического аппарата (и, как следствие, определять степень ухудшения ее физиологического состояния) в стрессовых ситуациях. Понятно, что такая процедура не требует большого количества клеток исследуемого штам-

ма, поэтому может быть применена как к хорошо культивируемым лабораторным пробам, так и к натурным некультивируемым видам цианобактерий. Таким образом, в данной работе предлагается простой и надежный метод мониторинга физиологического состояния цианобактериальной культуры и отдельных клеток, который может быть применен не только для определения физиологического состояния культуры в процессе роста и после различных внешних воздействий, но и для изучения более глубоких физиологических изменений происходящих в клетках цианобактерий.

Все исследования проведены с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ и ЦКП “Хромас”. Авторы отдельно благодарят Ресурсный центр “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ за предоставленные образцы штаммов цианобактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Волошко Л.Н., Пиневиц А.В., Копецкий И. и др.* Продуцируемые цианобактериями токсины в период “цветения” воды в Нижнем Суздальском озере (Санкт-Петербург, Россия) // Альгология. 2010. Т. 20. № 2. С. 210–223.
2. *Громов Б.В., Титова Н.Н.* Коллекция культур водорослей лаборатории Микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Межвузовский сборник. Л.: 1983. С. 3–27
3. *Карабашев Г.С.* Флуоресценция в океане. Л.: Гидрометеиздат, 1987. 199 с.
4. *Корнеев Д.Ю.* Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев: Альтерпрес, 2002. 191 с.
5. *Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Соьер В.Г., Краснов В.П.* Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода // Фундаментальные исследования. 2013. Т. 4. С. 112–120
6. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наукова думка, 1975. 247 с.
7. *Румянцев В.А., Григорьева Н.Ю., Чистякова Л.В.* Исследование изменений физиологического состояния цианобактерий после слабого ультразвукового воздействия // Докл. РАН. 2017. Т. 475. № 5. С. 580–583.
8. *Румянцев В.А., Поздняков Ш.Р., Рыбакин В.Н., Григорьева Н.Ю., Рудский И.В., Киселев Е.Ю., Коровин А.Н.* Многопрофильные натурные и лабораторные эксперименты по оценке работоспособности и экологической безопасности ультразвука

- при регуляции цветения цианобактерий // Ученые записки РГГМУ. 2017. Т. 46. С. 118–133.
9. *Blankenship R.E.* Molecular Mechanisms of Photosynthesis. 2nd Edition. Wiley, 2014. 314 p.
 10. *Bryant D.A.* (ed.) The Molecular Biology of Cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Press., 1994. 881 p.
 11. *Doosti M.R., Kargar R., Sayadi M.H.* Water treatment using ultrasonic assistance: A review. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences // Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences. 2012. V. 2. № 2. P. 96–110.
 12. *Eilola K., Meier H.M., Almroth E.* On the dynamics of oxygen, phosphorus and cyanobacteria in the Baltic Sea; a model study // J. of Marine Systems. 2009. V. 75 № 1. P. 163–184.
 13. *Fadeev V.V., Maslov D.V., Matorin D.N. et al.* Some peculiarities of fluorescence diagnostics of phytoplankton in coastal waters of the Black Sea // Earsel Eproceedings 2000. V. 1. P. 205–213.
 14. *Franklin D.J., Airs R.L., Fernandes M. et al.* Identification of senescence and death in *Emiliania huxleyi* and *Thalassiosira pseudonana*: cell staining, chlorophyll alterations, and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) metabolism // Limnol. Oceanogr. 2012. V. 57. P. 305–317.
 15. *Hao H., Wu W., Chen Y. et al.* Algae bloom control by ultrasonic irradiation at 20 kHz and 1.7 MHz // J. of Environmental Science and Health, Part A. 2004. V. 39. № 6. P. 1435–1446.
 16. *Huisman J., Matthijs H.C.P., Visser P.M.* Harmful cyanobacteria. Netherlands: Springer, 2005. 241 p.
 17. *Jakob T., Schreiber U., Kirschesch V. et al.* Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits // Photosynthesis Research. 2005. V. 83. P. 343–361
 18. *Mariné M.H., Clavero E., Roldán M.* Microscopy methods applied to research on cyanobacteria // Limnetica. 2004. V. 23. № 1–2. P. 179–186.
 19. *Millan-Almaraz J.R., Guevara-Gonzalez R.G., Romero-Troncoso R. et al.* Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: a review // African Journal of Biotechnology. 2009. V. 8. № 25. P. 7340–7349.
 20. *Paerl H.W.* Marine plankton // Ecology of Cyanobacteria II. Netherlands: Springer. 2012. P. 127–153.
 21. *Papageorgiou G.C., Tsimilli-Michael M., Stamatakis K.* The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint // Photosynthesis Res. 2007. V. 94. № 2–3. P. 275–290.
 22. *Pawley J.B.* Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York: Plenum Press, 1995. p. 600.
 23. *Peschek G.A., Obinger C., Renger G. (eds.).* Bioenergetic Processes of Cyanobacteria: From Evolutionary Singularity to Ecological Diversity. Dordrecht: Springer, 2011. 720 p.
 24. *Purcell D., Parsons S.A., Jefferson B. et al.* Experiences of algal bloom control using green solutions barley straw and ultrasound, an industry perspective // Water and Environment Journal. 2013. V. 27. № 2. P. 148–156.
 25. *Rajasekhar P., Fan L., Nguyen T., Roddick F.A.* A review of the use of sonication to control cyanobacterial blooms // Water research. 2012. V. 46. № 14. P. 4319–4329.
 26. *Roldan M., Ascaso C., Wierchos J.* Fluorescent fingerprints of endolithic phototrophic cyanobacteria living within halite rocks in the Atacama Desert // Applied and environmental microbiology. 2014. V. 80. № 10. P. 2998–3006.
 27. *Schreiber U., Schliwa U., Bilger W.* Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer // Photosynthesis Research. 1986. V. 10. P. 51–62.
 28. *Schulze K., Lopez D.A., Tillich U.M., Frohme M.* A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and ImageJ // BMC biotechnology. 2011. V. 11. P. 11–18.
 29. *Suggett D.J., Moore C.M., Hickman A.E., Geider R.J.* (2009) Interpretation of fast repetition rate (FRR) fluorescence: signatures of phytoplankton community structure versus physiological state // Mar. Ecol. Prog. Ser. V. 376 P. 1–19.
 30. *Whitton B.A. (ed.).* Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Netherlands: Springer Science & Business Media, 2012. 741 p.
 31. *Wolf E., Schübler A.* Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing // Plant, Cell & Environment. 2005. V. 28. № 4. P. 480–491.
 32. *Wu X., Joyce E.M., Mason T.J.* The effects of ultrasound on cyanobacteria // Harmful Algae. 2011. V. 10. № 6. P. 738–743.
 33. *Ying L., Huang X., Huang B. et al.* Fluorescence emission and absorption spectra of single *Anabaena* sp. strain PCC7120 cells // Photochemistry and Photobiology. 2002. V. 76. P. 310–313.

Spectroscopic Methods of Estimation of Blue-Green Algae Physiological State After Weak External Actions

N. Yu. Grigoryeva, L. V. Chistyakova, A. A. Liss

Today cyanobacterial blooms in open reservoirs and estuaries become the most important ecological problem. One of the ways to solve this problem is to develop innovative methods of control of the number of bloom-forming cyanobacteria based on weak external actions, which have no serious consequences for the whole ecological system. A novel effective technique of *in vivo* estimation of cyanobacterial viability for on-line ecological monitoring of the results of weak external actions was elaborated by us using a combination of different spectroscopic methods. It was shown that the results obtained by means of conventional spectrophotometry and fluorimetry for cyanobacterial culture as a whole and the data obtained by fluorescent spectral microscopy applied to a single cell are strictly related.