УДК 581.132

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ФИТОПЛАНКТОНА БАЛТИЙСКОГО МОРЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ

Д.Н. Маторин, С.И. Погосян, В.А. Осипов, Р. Хаптер*, А.Б. Рубин

(кафедра биофизики биологического факультета МГУ; Институт океанологии ПАН, Польша)*

Фитопланктон находится в основе морских экосистем, определяя их состояние и продуктивность. При действии различных экологических факторов и антропогенных загрязнений в первую очередь изменяются фотосинтетическая активность и концентрация клеток водорослей (Маторин, Венедиктов, 1990; Маторин и др., 1996; Falkowski, Raven, 1997). Изменения фотосинтеза фитопланктона приводят к изменениям в остальных звеньях водной экосистемы.

Для быстрой диагностики фитопланктона в природных условиях используются современные методы регистрации флуоресценции хлорофилла, которые позволяют получать информацию о количестве и активности фототрофных организмов, а также по характеристикам состояния фотосинтетического аппарата оценивать физиологическое состояния клеток и судить о качестве водной среды (Antal et al., 2001; Beutler et al., 2002). Важным преимуществом этих методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние фитопланктона непосредственно в среде его обитания in situ в режиме реального времени (Маторин и др., 1996). Оперативность измерений показателей флуоресценции на судах имеет особое значение при изучении мезомасштабных процессов в морских экосистемах, которые отличаются большой временной изменчивостью (Fadeev et al., 1999; Ostrowska, 2001; Ильяш и др., 2004; Погосян, Маторин, 2005).

Основой флуоресцентных методов является то, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей. Достижения в изучении механизмов первичных процессов фотосинтеза выявили связь показателей флуоресценции хлорофилла с характеристиками состояния фотосинтетического аппарата фотосинтезирующих организмов (Krause, Weis, 1991; Matorin et al., 2002). Энергия кванта света, поглощенного светособирающим комплексом, может быть превращена в энергию разделенных зарядов, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или за счет рассеяния в тепло. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтез возбуждающем свете (Fm) и условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (Fo), позволяет определить эффективность первичных процессов фотосинтеза, которая равна (Fm − Fo)/Fm = = Fv/Fm. Эффективность первичных процессов фотосинтеза (Fv/Fm) представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма (Krause, Weis, 1991). Интенсивность флуоресценции Fo с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию пигментов фотосинтетического аппарата фитопланктона, осуществляющих светосбор световой энергии, и соответственно также коррелируют с обилием фитопланктона (Ostrowska et al., 2000; Matorin et al., 2004).

Для работы с природным фитопланктоном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ был разработан современный комплекс флуоресцентной аппаратуры, включающий в себя бортовой флуорометр, погружной и проточный флуорометры (Маторин и др., 1996; Погосян и др., 2001; Pogosyan, Matorin, 2005). В настоящей работе приведены результаты работ по исследованию состояния фотосинтетического аппарата фитоценоза южной части Балтийского моря при помощи этого комплекса.

Методика

Экспедиционные исследования проводили в Гданьской бухте и открытой южной части Балтийского моря в международном рейсе НИС "Oceania" Института океанологии ПАН (Польша) с 15 по 24 апреля 2004 г. (см. схему станций на рис. 1).

Измерение по глубине параметров флуоресценции (Fo-обилие и Fv/Fm-фотосинтетическая активность) природного фитопланктона в естественных условиях с одновременной регистрацией температуры и подводной освещенности проводили погружаемым импульсным зондом-флуорометром, описанном в работе Маторина (1996).

Параметры флуоресценции хлорофилла (Fo и Fv/Fm) фитопланктона по ходу судна измеряли с помощью разработанного нами проточного флуорометра (Pogosyan, Matorin, 2005). Проточный флуорометр оснащен датчиком GPS для определения и регистрации координат и времени. Регистрация всех измеренных величин и управление прибором проводили по разработанной нами программе, позволяющей визуализировать и запоминать всю полученную информацию. Забор воды обеспечивали с глубины 50 см за счет разряжения, создаваемого водоструйным насосом, размещенным за измерительной камерой прибора, что обеспечивало нативность клеток водорослей.

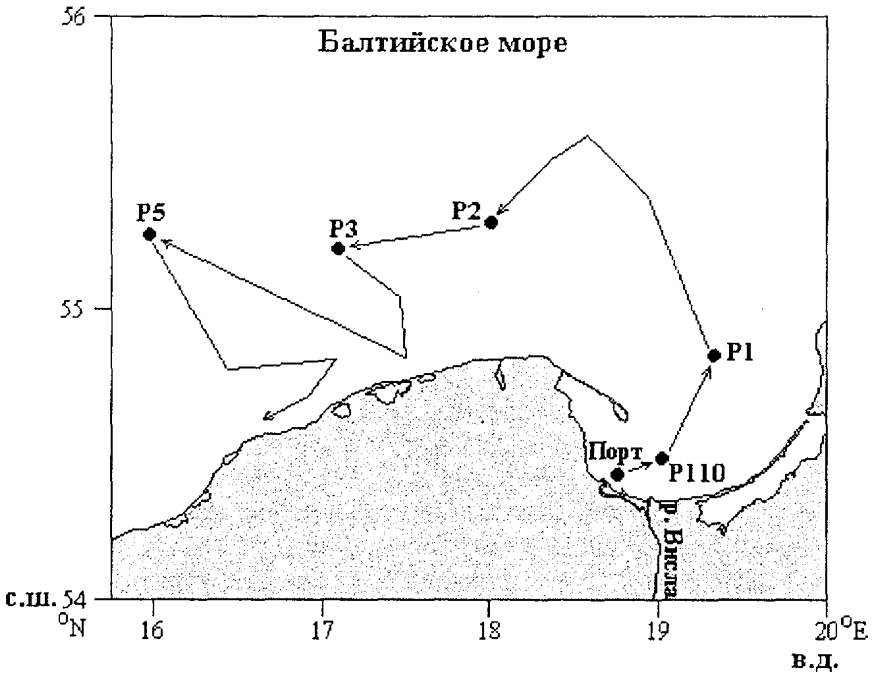

Рис. 1. Схема маршрута и расположения станций в Балтийском море во время рейса НИС "Oceania" 16—24 апреля 2004 г.

Для оперативного спектрофотометрического определения содержания пигментов водорослей в пробах воды на стеклянных волоконных фильтрах, а также в экстрактах пигментов применялся созданный на базе портативного спектрометра USB 2000 (Ocean Optics, Inc.) бортовой спектрофотометр. Прибор имел следующие характеристики: спектральный диапазон — 370—1100 нм; масса прибора менее 3 кг; точность измерения 0,005 единицы оптической плотности при оптической плотности образца 1; прибор оборудован интегрирующей сферой.

Результаты и обсуждение

Выяснение состояния фитопланктонного сообщества больших морских акваторий невозможно без информации о распределении вод по обилию водорослей и их фотосинтетической активности. Особенно важно получать такие данные по ходу судна с целью обнаружения градиентных зон и выбора станций для проведения детальных обследований фитопланктона. На рис. 2 представлен протокол измерения флуоресцентных параметров (Fo и Fv/Fm), полученных на проточном флуорометре 20 апреля 2004 г. при ночном переходе через Гданьскую бухту от стоянки судна до выхода из бухты. Данный разрез представлен 840 дискретными измерениями, каждое из которых было получено путем усреднения более 100 значений показаний флуорометра. Хорошо видно, что в районе порта и особенно в районе выноса вод реки Висла увеличивается как количество по Fo, так и фотосинтетическая активность (Fv/Fm) фитопланктона, что, естественно, связано с выносом биогенов. В остальной акватории залива также наблюдались достаточно высокие зна-

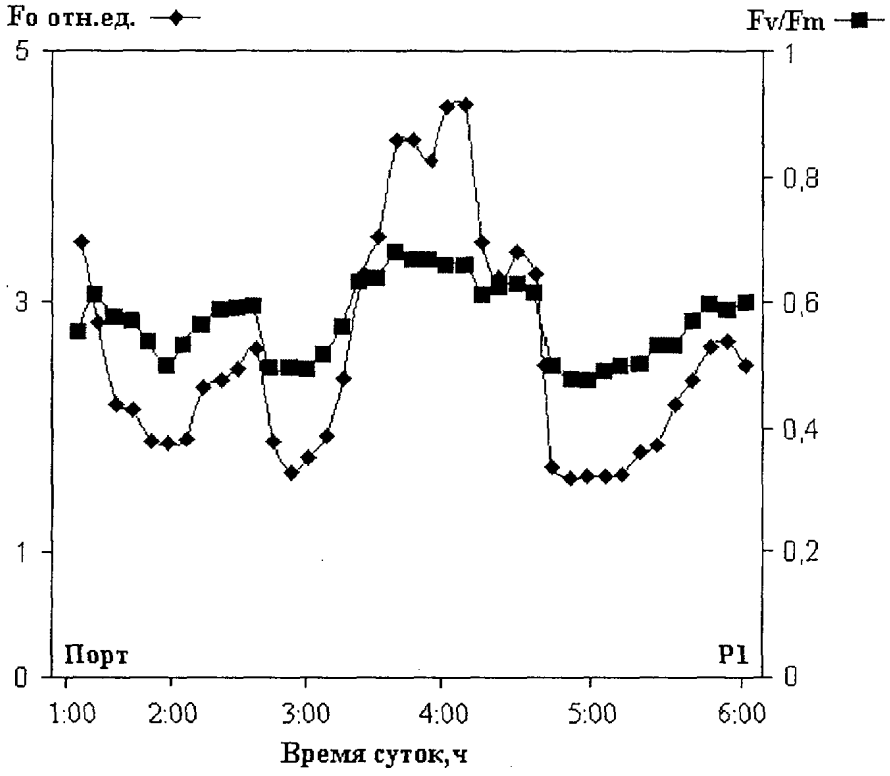

Рис. 2. Изменение параметров флуоресценции во время ночного перехода от станции Порт до станции P1 Балтийского моря.

Fo — обилие фитопланктона, Fv/Fm — фотосинтетическая активность. Измерения сделаны проточным флуорометром

чения этих параметров. Количество фитопланктона по концентрации хлорофилла, определенное прямым спектрофотометрическим методом и по откалиброванной флуоресценции, колебалось в поверхностных водах залива от 20 до 5 мкг/л. Следует отметить определенную корреляцию между параметрами флуоресценции хлорофилла Fv/Fm и Fo, которая показывает, что в весенний период цветения высокая фотосинтетическая активность также может реализоваться в интенсивном росте фитопланктона. Кроме того, измерения на проточном флуорометре позволили с высокой достоверностью определить пространственную неоднородность распределения и фотосинтетической активности фитопланктона поверхностных вод Гданьского залива.

В поверхностных водах в дневные часы под влиянием солнечного света могут происходить существенные изменения в функционировании фотосинтеза водорослей и, соответственно, в параметрах флуоресценции (Маторин и др., 1992). Эти процессы, известные как процессы полуденной депрессии фотосинтеза, или фотоингибирования, обусловлены нефотохимическим тушением возбужденных состояний хлорофилла (Falkowski, Raven, 1997). На рис. 3 представлены результаты измерения флуоресценции фитопланктона во время стоянки судна на ст. P1 с $5^{\underline{30}}$ утра до $13^{\underline{30}}$ часов дня методом проточной флуорометрии. В утренние часы (с 6 до 8 часов) при низкой освещенности не происходило изменений Fo, хотя параметр Fv/Fm несколько уменьшался. При сильном увеличении солнечной инсоляции в дневные часы наблюдалось снижение Fo, которое сопровождалось дальнейшим уменьшением фотосинтетической активности по Fv/Fm. Значительный спад флуоресценции Fo при интенсивном освещении был ранее описан нами на культурах микроводорослей при недостатке азота (Вавилин и др., 1999). При снижении освещенности в вечернее время происходило восстановление значения Fo и Fv/Fm. Величина уменьшения Fo в дневные часы зависела от освещенности. В пасмурные дни с переменной облачностью наблюдалось слабое изменение параметра Fo в дневные часы.

Степень фотоингибирования и снижения Fo может существенно различаться для фитопланктона в различных условиях и местах обитания. В связи с этим при определении обилия фитопланктона по показаниям флуоресцентных датчиков в дневные солнечные часы необходимо учитывать влияние инсоляции на флуоресценцию фитопланктона данного района путем введения поправочных коэффициентов. Для этого следует проводить адаптацию фитопланктона в темноте и исследовать процессы восстановления Fo после интенсивной инсоляции. Время восстановления значений Fo после помещения проб воды в темноту для нескольких станций составляло несколько часов. Эксперименты с добавлением ингибитора синтеза хлоропластных белков хлорфеникола (Vavilin et al., 1998) показали, что процесс восстановления значений Fo в клетках фитопланктона в значительной степени обусловлен ресинтезом хлоропластных

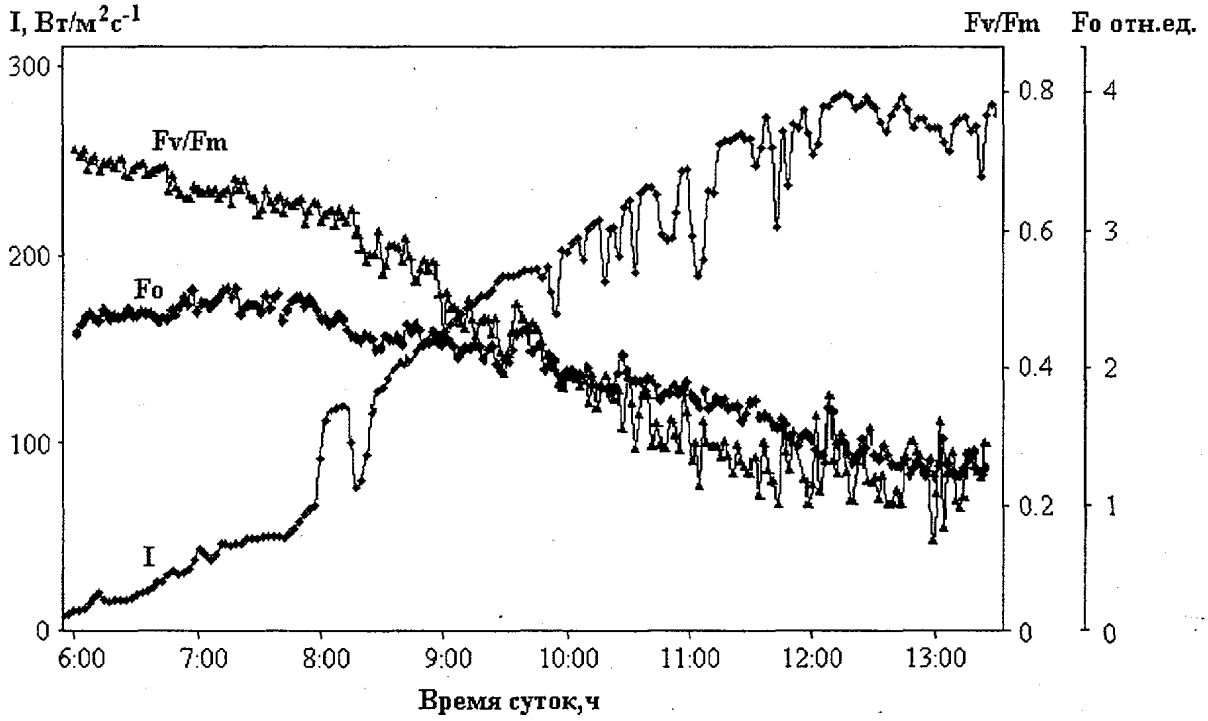

Рис. 3. Кривые изменения освещенности I (Вт/м²) и параметров флуоресценции Fo (отн.ед.) и Fv/Fm микроводорослей в дневные часы на ст. P1 в Балтийском море.

Измерения сделаны проточным флуорометром

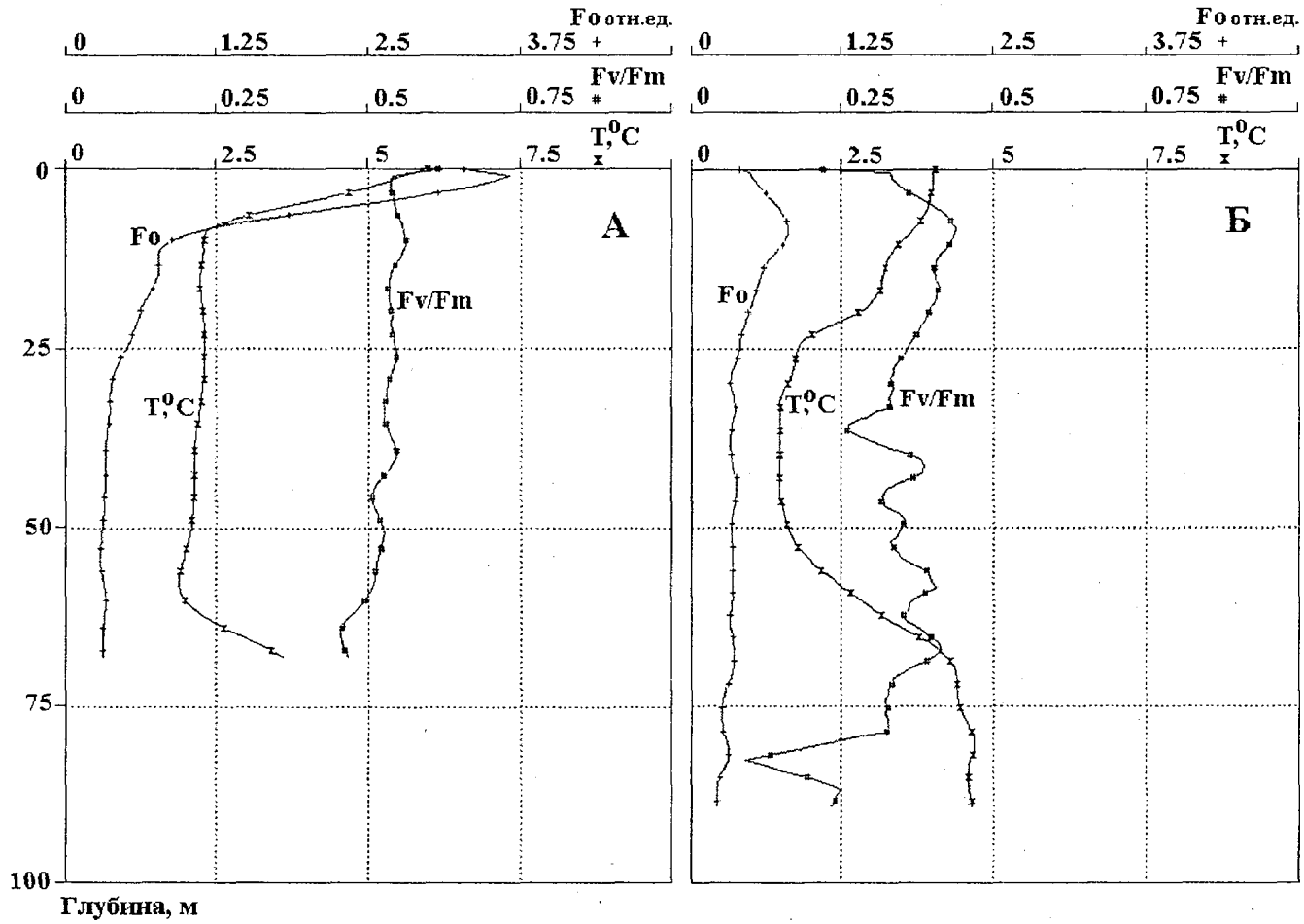

Рис. 4. Кривые распределения по глубине количества (Fo, отн. ед.), фотосинтетической активности (Fv/Fm) природного фитопланктона и температуры воды (Т, °С).

Измерения проводили погружным флуорометром на станции Р110 в Гданьском заливе (А) и на станции Р3 в открытой части Балтийского моря (Б)

белков. То есть избыточное освещение приводит к повреждению части белков реакционных центров фотосинтетического аппарата водорослей (Маторин и др., 2001), что и вызывает процессы нефотохимического тушения флуоресценции Fo.

Типичные глубинные профили параметров флуоресценции и температуры, зарегистрированные с помощью погружного зонда на станциях, представлены на рис. 4. В Гданьской бухте температура в поверхностном горизонте составляла 5—6° и резко понижалась до 1—2° на глубине 10—60 м. В более глубоких слоях происходило повышение температуры. В открытой части моря характер изменения температуры имел аналогичный вид, однако поверхностные воды, по-видимому, еще мало прогрелись, и температура их была ниже на несколько градусов по сравнению с бухтой (рис. 4, *Б*).

В Гданьской бухте в поверхностном слое наблюдалась высокая фотосинтетическая активность по переменной флуоресценции (Fv/Fm), что, как правило, соответствовало большому обилию фитопланктона (рис. 4, *А*). Это характерно для квазистационарных условий существования популяции фитопланктона (минеральное питание, температурный и световой режим). В более глубоких слоях с понижением температуры наблюдалось резкое снижение количества фитопланктона, однако клетки обладали достаточно высокой активностью. Эта ситуация типична для начальной фазы сукцессии фитоцена, когда высокая эффективность фотосинтеза еще не реализовалась в высокой величине биомассы. Подобный эффект отмечался нами и для некоторых близких к берегу станциях в открытых районах моря. По-видимому, появление клеток с высокой активностью в этих условиях может указывать на возможность увеличения обилия клеток и вероятного начала цветения водорослей в этих водах. С другой стороны, на культурах микроводорослей нами ранее показано, что при низкой активности первичных реакций фотосинтеза, регистрируемой по переменной флуоресценции Fv/Fm в неблагоприятных условиях роста, наблюдается низкая скорость роста клеток (Маторин, Венедиктов, 1990). В открытой части моря нами были выявлены районы (рис. 4, *Б*), где наблюдалась низкая эффективность фотосинтеза при низких значениях обилия фитопланктона, что соот-

ветствует неблагоприятным условиям роста водорослей, которые, по-видимому, еще находились в состоянии зимнего покоя.

Заключение

Таким образом, использование комплекса флуорометрических методов позволяет проводить детальное исследование состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона и выяснять пространственно-временную изменчивость фитоценоза. Измерения параметров флуоресценции in situ, в отличие от традиционных гидробиологических методов исследования, позволяют получать данные о содержании фитопланктона и эффективности его функционирования в режиме реального времени, что важно для совмещения спутниковых и наземных наблюдений. Однако в отличие от спутниковых наблюдений, ограниченных только содержанием фитопланктона в поверхностном слое, использование погружаемого импульсного зонда-флуорометра дает возможность связать изменения гидродинамических структур поверхностных вод с изменениями физиологического состояния фитоценоза в толще водной массы. Флуорометрия в протоке дает информацию об изменчивости обилия и фотосинтетической активности фитопланктона по ходу судна в реальном времени, что позволяет обнаруживать градиентные зоны и выявлять мезомасштабные структуры в море. Все это позволяет оперативно получать 2—3-мерные карты распределения и активности фитопланктона по акватории.

Анализ ответных реакций первичных процессов фотосинтеза фитопланктона на режим освещения и исследование процессов репарации после фотоповреждения позволяет выявить, к каким световым условиям адаптированы клетки фитопланктона, и оценить адаптивные возможности этих организмов в районе работ. Детальное исследование фотосинтетической активности популяций и динамики обилия водорослей позволяет оценить состояние фитоценоза и дать прогноз его развития. Полномасштабный анализ изменений экосистемы Балтийского моря под действием климатических и антропогенных факторов невозможен без длительных систематических исследований состояния фитопланктонного сообщества. Рассмотренные в данной статье современные флуоресцентные экспресс-методы и аппаратура представляются наиболее перспективными для получения данных об изменчивости фитоценоза Балтийского моря и уже используются польскими коллегами в этих целях (Ostrowska, 2000).

* * *

Работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП Миннауки № 43.634.11.00017, грантами РФФИ—ИШ—1770.2003.4.05.04—48912, Европейского гранта CeSSS, EVK3—CT—2002—80003 и Польского гранта PZB—KBN 056/P04/2001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вавилин Д.В., Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. 1999. Два типа неактивных центров фотосистемы II у зеленой водоросли Chlorella, выращенной в условиях недостатка минерального азота // Физиол. раст. **46**. № 5. 679—685.

Ильяш Л.В., Маторин Д.Н., Кольцова Т.И., Шам Х. 2004. Пространственное распределение и суточная динамика фитопланктона залива Нячанг Южно-Китайского моря // Океанология. **44**. № 2. 238—248.

Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. 1990. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона // Итоги науки и техн. ВИНИТИ. Сер. Биофизика. **40**. 49—100.

Маторин Д.Н., Васильев И.Р., Ведерников В.И. 1992. Исследование фотоингибирования первичных реакций фотосинтеза у природных популяций фитопланктона Черного моря // Физиол. раст. **39**. № 3. 455—463.

Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Коневев Ю.Н., Казимирко Ю.В., Рубин А.Б. 1996. Использование двухвспышечного импульсного погружного флуорометра для определения фотосинтетической активности природного фитопланктона // Докл. РАН. **350**. № 2. 256—258.

Маторин Д.Н. 2000. Использование флуоресцентных методов измерения активности фотосистемы II при биомониторинге фитопланктона // Биофизика. **45**. № 3. 491—494.

Погосян С.И., Маторин Д.Н., Волкова Э.В., Антал Т.К., Казимирко Ю.В., Востоков С.В., Рубин А.Б. 2001. Использование комплекса флуорометрических методов для оценки состояния фитопланктонного сообщества моря // Комплексные исследования северо-восточной части Черного моря / Под ред. А.Г. Зацепина, М.В. Флинта. М. С. 436—447.

Погосян С.И., Маторин Д.Н. 2001. Изменчивость состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона Черного моря // Океанология. **45**. № 6.

Antal T.K., Venediktov P.S., Matorin D.N., Ostrowska M., Wozniak B., Rubin A.B. 2001. Measurement of phytoplankton photosynthesis rate using a pump-and-probe fluorometer // Oceanologia. **43**. N 3. 291—313.

Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Luring C., Meyerhofer M., Hansen U.-P., Dau H. 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ // Photosynthesis Research. **72**. 39—53.

Fadeev V.V., Filippova E.M., Maslov D.V., Matorin D.N. 1999. Diagnostics of photosynthesising organisms by linear and non-linear fluorimetry // Proc. of SPIE. 304—315.

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

Krause G.H., Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics // Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **42**. 313—349.

Matorin D.N., Vuksanovich N., Rubin A.B., Venediktov P.S. 2002. Application of chlorophyll fluorescence in studied of phytoplankton in the Mediterrancan Sea // Studia Marina. **23**. 79—86.

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

Ostrowska M., Majchrowski R., Matorin D.N., Wozniak B. 2000. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 1: Theory of classical in situ chlorophyll fluorometry // Oceanologia. **42**. N 2. 203—219.

Ostrowska M. 2001. The application of fluorescence methods to the study of marine photosynthesis // Zaklad Poligrafii FRUG. Sopot. P. 194.

Vavilin D.V., Ducruet J.-M., Matorin D.N., Venedictov P.S., Rubin A.B. 1998. Changes in Photosystem II activity, cell viability and the amplitude of high-temperature bands of chlorophyll thermoluminescence in green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions // J. Photochem. Photobiol. Biology. **42**. N 3. 233—239.

INVESTIGATION OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF PHYTOPLANKTON IN THE BALTIC SEA BY FLUORESCENCE METHODS

D.N. Matorin, S.I. Pogosyan, V.A. Osipov, R Hapter, A.B. Rubin

The results of researches of distribution and photosynthetic activity of phytoplankton in a southern part of the Baltic Sea received in the scientific cruise on board of r/v "Oceania" in April, 2004 with use flowing and submersible fluorometers are given. The methodology of use of parameters of chlorophyll fluorescence for monitoring phytoplankton of seawater areas is discussed.