БИОФИЗИКА

УДК 57.032

ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ФОСФОРНОГО ГОЛОДАНИЯ В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE)

А.Г. Кузнецов[1], С.И. Погосян[1], И.В. Конюхов[1], С.Г. Васильева[2], А.А. Лукьянов[2], В.С. Зотов[3], Л. Недбал[4], А.Е. Соловченко[2,5,*]

[1]Кафедра биофизики и [2]кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;
[3]ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2;
[4]Институт биологии и геологии (IBG-2), Исследовательский центр Юлих (FZJ), Германия, 52428, г. Юлих, Вилем-Йонен штрассе, 2;
[5]Евразийский центр по продовольственной безопасности, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
[*]e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Исследования влияния обеспеченности неорганическим фосфором (P_i), важным биогенным элементом, на рост и физиологические параметры одноклеточных водорослей важны для определения динамики численности и продуктивности фитопланктона в природных экосистемах и промышленных системах с целью культивирования этих организмов. Затруднения при проведении таких исследований связаны со сложной кинетикой поглощения P_i клетками и способностью микроводорослей к внутриклеточному запасанию фосфора. В этой связи необходимы эффективные способы экспресс-мониторинга состояния культур микроводорослей. Данным критериям отвечают методы, основанные на регистрации оптических свойств клеток, таких как поглощение и рассеяние света культурами и флуоресценции содержащегося в клетках хлорофилла. В настоящей статье описаны результаты мониторинга культуры зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, культивируемой в среде, не содержащей фосфора. Установлено, что и оптические (поглощение света в полосах фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и каротиноидов), и люминесцентные (переменная флуоресценция хлорофилла) параметры отражают состояние культуры. При регистрации оптических свойств необходима коррекция вклада светорассеяния в общее ослабление света суспензиями клеток микроводорослей, при этом сам по себе уровень светорассеяния является точной мерой общего количества взвешенных частиц в суспензии. Однако мониторинг культур, содержащих значительное количество светорассеивающих частиц без фотосинтетических пигментов (таких как гетеротрофные бактерии) затруднен. Для подобных культур оптимальным является использование переменной флуоресценции – например, параметра Fv/Fm, отражающего максимальную фотохимическую эффективность фотосистемы II.

Ключевые слова: *микроводоросли, светорассеяние, фосфорное голодание, флуоресценция хлорофилла, фотобиореактор, Chlorella vulgaris*

Фосфор – ключевой биогенный элемент, критически важный для хранения и передачи энергии и информации в живой клетке, в том числе в клетке одноклеточных водорослей (микроводорослей) [1]. Для большинства водных экосистем характерны олиготрофные условия; именно обеспеченность фосфором во многих случаях определяет динамику численности и продуктивности фитопланктона. Неконтролируемый сброс обогащенных фосфором сточных вод вызывает вспышки численности («цветение») микроводорослей, в том числе токсичных, и эвтрофикацию в природных водоемах. С другой стороны, культивирование микроводорослей считается перспективным способом биологической очистки сточных вод, обеспечивающим устойчивое использование невозобновляемых ресурсов фосфора [2, 3].

В этой связи крайне важно понимание связи между обеспеченностью фосфором, кинетикой роста (деления) и функциональным состоянием клеток микроводорослей. Однако исследование этих зависимостей у микроводорослей затруднено сложной кинетикой поглощения фосфора из среды, а также обилием и многообразием внутриклеточных ресурсов фосфора у этих организмов [4]. Методы аналитического определения содержания фосфора в средах и биологических объектах сложны и требуют много времени, а зачастую и дорогостоящего оборудования. Необходимы экспресс-методы для наблюдения за состоянием культур и надежной регистрации стрессовых состояний, вызванных дефицитом фосфора, а также изменений, вызванных возобновлением фосфорного питания.

Вышеизложенным критериям отвечают методы, основанные на регистрации оптических свойств клеток, таких как поглощение и рассеяние света культурами, а также флуоресценции содержащегося в клетках хлорофилла. В настоящее время это методы широко применяются для оценки состояния микроводорослей и его изменений под влиянием дефицита либо избытка азота в природных водоемах [5, 6] и искусственных культивационных системах (фотобиореакторах) [7–10]. Однако публикаций, посвященных оптическому мониторингу изменений при фосфорном голодании и выходе из него, среди доступных нам источников не оказалось. Одна из ключевых трудностей при использовании оптических методов мониторинга культур связана с выбором подходящих спектральных индексов и (или) флуоресцентных параметров. В настоящей статье описаны результаты использования оптических методов для мониторинга фосфорного голодания зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1.

Материалы и методы

Штамм *Chlorella vulgaris* IPPAS C–1 получен из коллекции IPPAS (Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН). Клетки культивировали на полной BG-11 [11] либо лишенной фосфора (BG-11/–P) среде в кольцевом фотобиореакторе собственной конструкции (толщина слоя суспензии – 2 см, объем – 2 л) при температуре 28°C, интенсивность света – 130 мкмоль квантов ФАР$\cdot$м$^{-2}\cdot$с$^{-1}$ и продувании атмосферным воздухом. Культивирование вели при постоянном pH 7,0–7,5, который поддерживали прямым введением в культуру CO_2 через магнитный клапан, управляемый pH-контроллером собственной конструкции.

Предкультуру *C. vulgaris* выращивали в 300 мл полной среды BG-11 в колбах Эрленмейера (500 мл) в шейкере-инкубаторе INNOVA 44R (New Brunswick, США) при 28°C, 70 мкмоль квантов ФАР$\cdot$м$^{-2}\cdot$с$^{-1}$, 120 об./мин. Перед культивированием в фотобиореакторе клетки собирали центрифугированием (5 мин при 3000 *g*), отмывали средой BG-11/–P и ресуспендировали в 2 л той же среды (начальная оптическая плотность при 678 нм – 0,5). При культивировании поддерживали оптическую плотность (далее по тексту – OD, optical density) при 678 нм, OD_{678}, ниже 0,5 единиц, ежесуточно разбавляя культуру средой BG-11/–P. Моментом наступления фосфорного голодания считали момент прекращения деления клеток. Для возобновления роста культуры в течение суток с этого момента добавляли P_i в виде KH_2PO_4 (конечная концентрация – 180 мкмоль/л).

Число и размерное распределение клеток в образцах суспензии определяли с помочью анализатора частиц Multisizer 3 (Beckman-Coulter, США). Визуально состояние культуры контролировали под оптическим микроскопом DM2500 (Leica, Германия). Содержание неорганического фосфата (P_i) в среде и общего фосфора в клетках определяли с использованием хромогенной реакции с молибденовым синим [12]. Содержание нитратного азота в среде определяли методом ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа ICS 1600 (Thermo Scientific, США). Регистрацию кривых индукции флуоресценции хлорофилла и спектров оптического поглощения суспензии осуществляли с помощью проточных детекторов собственной конструкции согласно ранее описанному протоколу [13, 14].

Измеренные спектры поглощения корректировали на светорассеяние следующим образом [13, 15]: снимали спектры $D(\lambda)$ при стандартном расположении кюветы вблизи входного окна интегрирующей сферы спектрофотометра и на расстоянии 1 см от нее, что соответствовало углам сбора света γ_0 и γ_I. Спектры поглощения, компенсированные на рассеяние, рассчитывали как

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; \gamma_I) - [D^{\gamma I}{}_{NIR}/(D^{\gamma I}{}_{NIR} - D^{\gamma 0}{}_{NIR})] \times \times [D(\lambda; \gamma_I) - D(\lambda; \gamma_0)] ,$$

где $\tilde{A}(\lambda)$ – спектр, компенсированный на светорассеяние; $D(\lambda; \gamma_0)$ – спектр, записанный при стандартном расположении кюветы; $D(\lambda; \gamma_I)$ – спектр, записанный при удаленном расположении кюветы; $D^{\gamma I}{}_{NIR}$, $D^{\gamma 0}{}_{NIR}$ – оптическая плотность в ближней инфракрасной области (760–800 нм), в которой пигменты не обладают заметным поглощением.

Кривые индукции флуоресценции хлорофилла записывали на флуориметре Mega-25, разработанном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ [5]. Для возбуждения флуоресценции использован синий светодиод (450 нм, 7500 мкмоль квантов$\cdot$м$^{-2}\cdot$с$^{-1}$). Флуоресценция детектируется в области 670–800 нм. Продолжительность записи кривой индукции 1 с. На основе зарегистрированных кривых индукции флуоресценции хлорофилла рассчитывали отражающий максимальную квантовую эффективность фотохимических реакций в фотосистеме II параметр Fv/Fm:

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm,$$

где Fm – максимальная, а Fo – минимальная интенсивность флуоресценции хлорофилла [6, 7].

Культивационные эксперименты проводили в трех последовательных независимых повторностях (циклах), результаты которых представлены на рисунках. Для расчета коэффициентов корреляции в программе Origin 8.0 (Microcal, США) результаты, полученные во всех циклах, объединяли (n = 37; коэффициенты корреляции достоверны на уровне значимости 0,01).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе регистрировали значительное количество данных о культуре, включая спектры поглощения в диапазоне 400–800 нм и кривые ин-

дукции флуоресценции хлорофилла с временным разрешением 1 мкс. В итоге для исследования были отобраны значения поглощения в области длинноволнового максимума поглощения хлорофилла (678 нм) и в полосе совместного поглощения хлорофиллов и каротиноидов в синей области (490 нм). Оптическую плотность в этих полосах анализировали как по отдельности, так и в виде отношения OD_{490}/OD_{678} (рис. 1). Данное отношение является чувствительным индикатором величины стресса у микроводорослей, в том числе стресса, вызванного дефицитом биогенных элементов [10, 14]. Кроме того, использовали значения оптической плотности в ближней ИК-области (800 нм), свободные от влияния поглощения света пигментами, но несущие информацию о числе, размерах и форме клеток и иных частиц в образцах суспензии [13]. На основании кривых индукции флуоресценции хлорофилла рассчитывали показатель Fv/Fm, широко применяемый для диагностики физиологического состояния микроводорослей [7–10].

Условия культивационных экспериментов были подобраны так, чтобы создать в культуре микроводорослей дефицит фосфора, но исключить дефицит других элементов минерального питания и дефицит световой энергии. Существенно, что в первые несколько суток после ресуспендирования клеток *C. vulgaris* в бесфосфорной среде рост культуры продолжался и культуру требовалось разбавлять во избежание лимитирования роста клеток недостатком световой энергии (рис. 1). По всей видимости, задержка фенотипического проявления дефицита фосфора совпадает с периодом расходования внутриклеточных резервов фосфора [16]. Лишь через 48–72 ч наблюдали замедление, а затем остановку деления клеток. Через 2–4 ч после добавления в среду P_i (конечная концентрация – 180 мкмоль/л) деление клеток возобновлялось. Следует отметить, что добавленный P_i уже через 2 ч был полностью поглощен клетками микроводорослей (данные не приводятся). Типичный эксперимент включал три последовательных цикла добавления–поглощения P_i (рис. 1).

Эти процессы сопровождались направленными изменениями оптических свойств суспензии, отражающими как увеличение числа клеток, так и накопление фотосинтетических пигментов в культуре (рис. 1А). При этом кинетика изменений отношения OD_{490}/OD_{678} в каждом цикле эксперимента была двухфазной: при действии дефицита фосфора оно увеличивалось, достигая максимума в момент остановки деления клеток, а после добавления P_i – снижалось (рис. 1Б). Судя по параллельно регистрируемым изменениям OD_{678}, отражающим динамику содержания хлорофилла, и по ранее опубликованным данным [10, 14], такие изменения OD_{490}/OD_{678} свидетельствуют о редукции фотосинтетического аппарата (снижении содержания хлорофилла) при акклимации к дефициту фосфора на фоне действия света высокой интенсивности (130 мкмоль$\cdot$м$^{-2}\cdot$с$^{-1}$ ФАР). Тенденция изменений показателя Fv/Fm, основанного на флуоресценции хлорофилла, была противоположной (рис. 1А, Б, правая шкала): стресс, вызванный дефицитом фосфора, приводил к снижению эффективности фотохимических реакций и, как следствие, к падению переменной

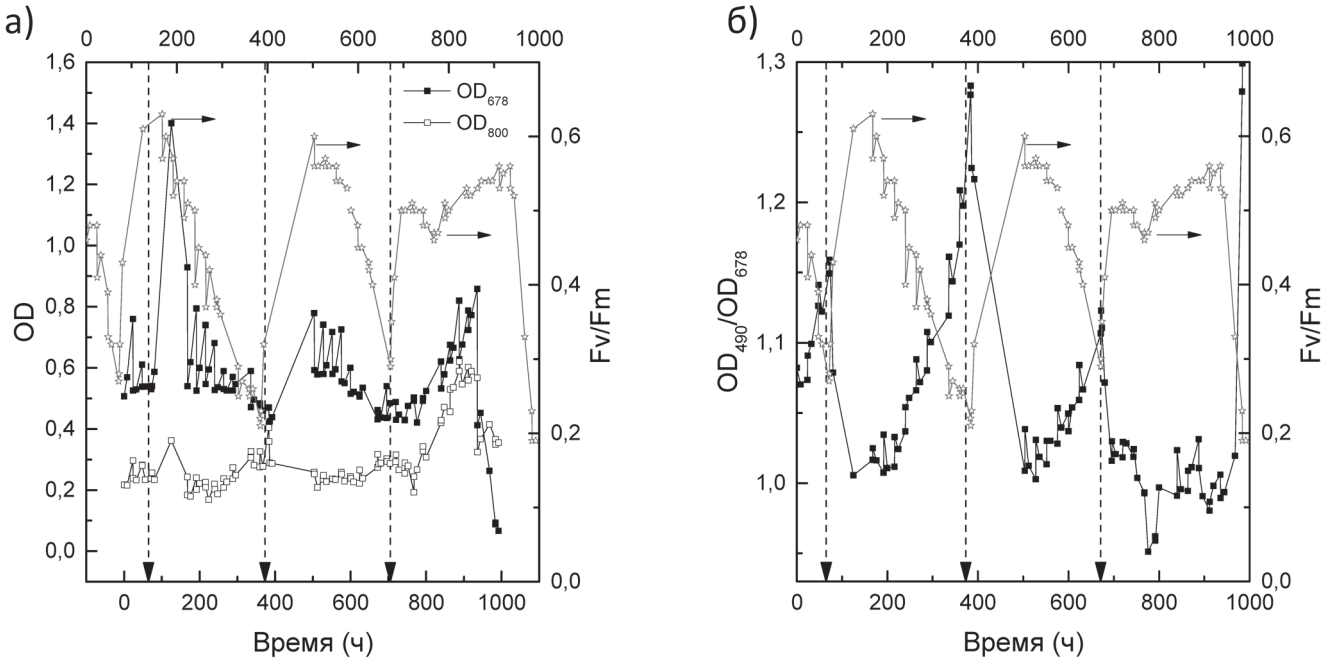

Рис. 1. Динамика оптической плотности (OD) и переменной флуоресценции хлорофилла (Fv/Fm) в культурах микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 при дефиците P_i (см. Материалы и методы). **А** – динамика оптической плотности в полосе длинноволнового максимума поглощения хлорофилла (678 нм) и в ближней ИК-области (800 нм), **Б** – динамика отношения OD_{490}/OD_{678}. На панелях **А** и **Б** по правой шкале отображается переменная флуоресценция хлорофилла. Пунктирные стрелки – моменты добавления P_i (конечная концентрация – 180 мкмоль/л) в среду культивирования

флуоресценции хлорофилла. Вероятной причиной этого процесса является индукция нефотохимического тушения – распространенного ответа микроводорослей на действие стрессоров различной природы [17, 18].

Следует отметить, что эффективность оптического показателя интенсивности стресса (OD_{490}/OD_{678}) из-за дефицита фосфора зависела от наличия в суспензии частиц, рассеивающих свет, но не содержащих фотосинтетические пигменты, следовательно, и от коррекции вклада светорассеяния (рис. 2; см. также другие работы [13, 14]). Результаты анализа распределения частиц в образцах суспензий, взятых на разных этапах эксперимента, показали, что в наших экспериментальных условиях культуры в логарифмической фазе роста (кривая *1* на рис. 2А) содержат преимущественно клетки микроводоросли (диаметр около 4 мкм) и фракцию мелких частиц (<1 мкм), представленную, вероятно, обломками клеток, гетеротрофными бактериями и иными частицами. На ранней и, в особенности, на поздней стационарной стадии роста (кривые *2* и *3* на рис. 2А) доля мелких частиц возрастала, появлялись частицы размером около 2 мкм (клетки бактерий). При этом численность клеток микроводорослей в культурах, испытывающих сильный дефицит фосфора (кривая *3* на рис. 2А), значительно снижалась. Накопление светорассеивающих частиц значительно увеличивало мутность суспензии (OD_{800} на рис. 1А). Это снижало силу корреляции между оптическим (OD_{490}/OD_{678}) и люминесцентным (Fv/Fm) параметрами, отражающими состояние культуры (до $r^2 = 0{,}70$; рис. 2Б). При расчете показателя OD_{490}/OD_{678} с использованием значений оптической плотности, скорректированных на вклад светорассеяния [13], сила корреляции увеличивалась ($r^2 = 0{,}84$; рис. 2Б).

Соответственно, для регистрации физиологического состояния культуры при стрессе, вызванном фосфорным голоданием, возможно использование обоих показателей. Однако для получения корректных результатов с применением OD_{490}/OD_{678} необходима компенсация вклада светорассеяния в общее ослабление света образцом суспензии. Важно отметить, что даже использование спектрофотометра с интегрирующей сферой не полностью решает эту проблему. Один из способов компенсации вклада светорассеяния требует измерения двух спектров поглощения с размещением кюветы с образцом на двух разных расстояниях от детектора [13]. Практическая реализация этого подхода в автоматизированной системе потребует использования двухканального проточного спектрометра, что дорого и не во всех случаях практично. Возможно, метод записи спектров с опаловым стеклом [19] окажется более подходящим для автоматизированных измерений спектров поглощения, скорректированных на помехи из-за потерь света, связанных со светорассеянием.

Наряду с оценкой степени фосфорного голодания, для комплексной регистрации состояния культуры необходима, как минимум, информация о динамике накопления биомассы (приросте числа клеток либо накоплении хлорофилла культурой). Подсчет клеток вручную отнимает много времени и не дает надежных результатов, проточные счетчики клеток сложны в обслуживании и дороги. Оптимальным для использования в автоматизиро-

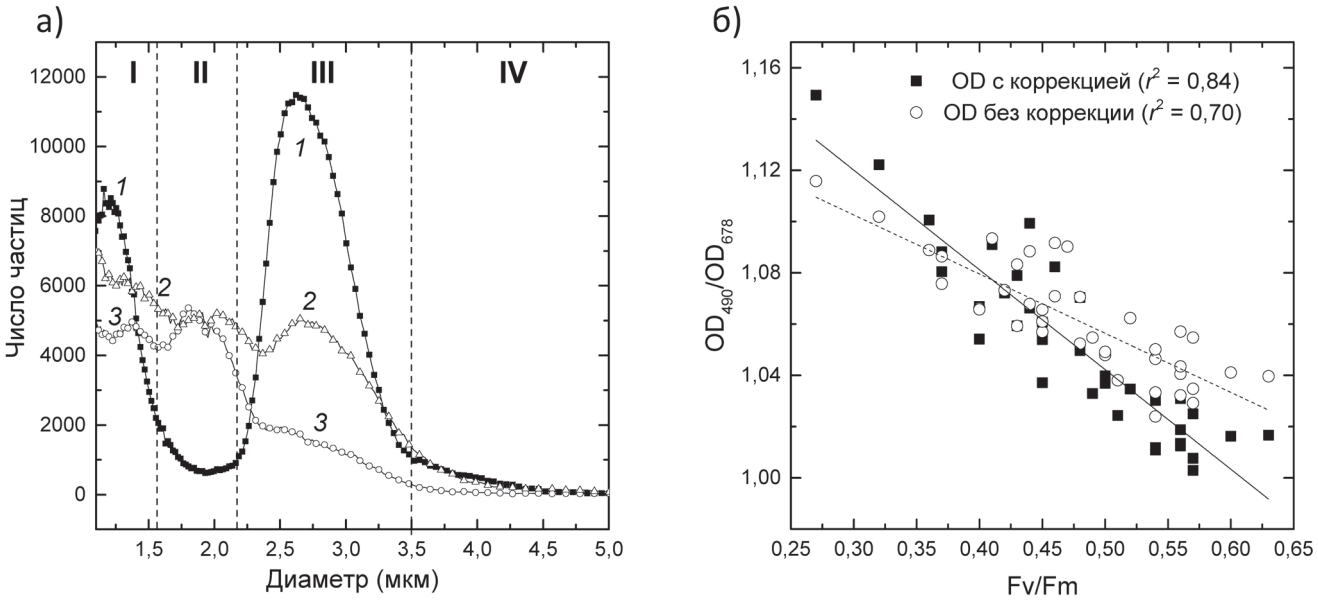

Рис. 2. Влияние помех от светорассеяния на связь между оптическими и люминесцентными параметрами, отражающими физиологическое состояние клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*. **А** – распределение частиц по размеру в логарифмической фазе роста (*1*), а также в ранней (*2*) и поздней (*3*) стационарной фазе, вызванной дефицитом P_i. Размерные интервалы: I – обломки клеток, II – бактериальные клетки, III – клетки *C. vulgaris*, IV – клеточные агрегаты. **Б** – влияние коррекции помех от светорассеяния на связь между оптическими (OD_{490}/OD_{678}) и люминесцентными (Fv/Fm) параметрами, отражающими интенсивность стресса, вызванного дефицитом P_i

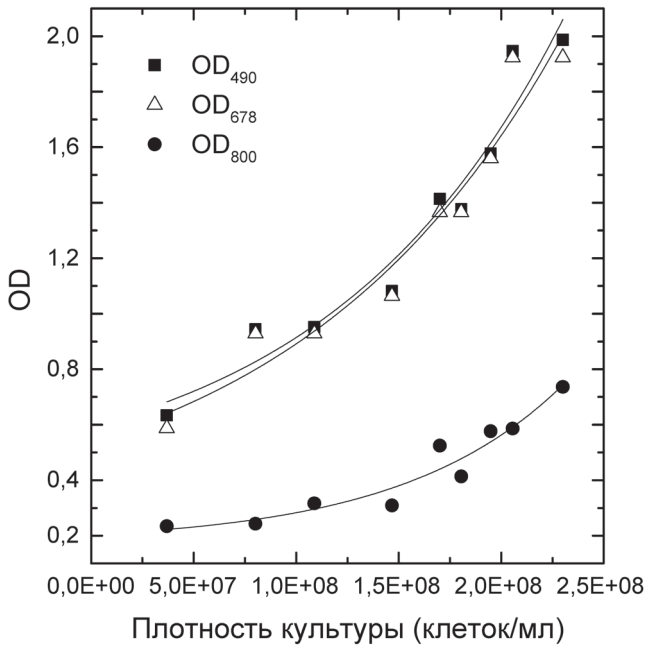

Рис. 3. Зависимость оптической плотности (OD) в полосах, использованных в данной работе, от плотности культуры. Во всех случаях вводилась поправка на вклад светорассеяния; $r^2>0{,}93$, $n=9$

ванных системах культивирования микроводорослей представляется регистрация динамики числа клеток по косвенным показателям (изменения оптической плотности). При этом могут быть использованы спектральные полосы поглощения фотосинтетических пигментов как в видимой области, так и за ее пределами (в ближней ИК-области) — для регистрации мутности суспензии, связанной с числом светорассеивающих частиц (клеток). В наших экспериментальных условиях оптическая плотность при 490 и 678 нм сильно коррелировала с числом клеток, равно как и экстинкция при 800 нм, при этом зависимость между указанными параметрами и числом клеток была близка к линейной (рис. 3). Существенно также, что эта корреляция сохранялась в весьма широком диапазоне плотности культуры, оптическая плотность при этом оставалась в пределах 0,2–2,0, что обеспечивало высокую фотометрическую точность метода.

Таким образом, регистрация оптических и люминесцентных параметров является удобным и надежным показателем физиологического состояния культуры микроводорослей при варьирующей обеспеченности фосфором. При этом мониторинг по поглощению света необходимо вести с поправкой на вклад светорассеяния в общее ослабление света образцом суспензии клеток микроводоросли. Силу стресса, вызванного дефицитом фосфора, адекватно отражают показатели O_{D490}/OD_{678} и Fv/Fm, связанные с функциональным состоянием фотосинтетического аппарата. Люминесцентный параметр Fv/Fm является более чувствительным и, в наших экспериментальных условиях, менее подвержен помехам от светорассеяния.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (соглашение № 14.616.21.0080).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grossman A.R.*, *Aksoy M.* Algae in a phosphorus-limited landscape // Annual plant reviews. Vol. 48. Phosphorus metabolism in plants / Eds. W. Plaxton and H. Lambers. John Wiley & Sons, 2015. P. 337–374.

2. *Solovchenko A.*, *Verschoor A.M.*, *Jablonowski N.D.*, *Nedbal L.* Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae // Biotechnol. Adv. 2016. Vol. 34. N 5. P. 550–564.

3. *Schreiber C.*, *Schiedung H.*, *Harrison L.*, *Briese C.*, *Ackermann B.*, *Kant J.*, *Schrey S.D.*, *Hofmann D.*, *Singh D.*, *Ebenhöh O.*, *Amelung W.*, *Schurr U.*, *Mettler-Altmann T.*, *Huber G.*, *Jablonowski N. D.*, *Nedbal L.* Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants // J. Appl. Phycol. 2018. DOI 10.1007/s10811-018-1390-9.

4. *Cembella A.D.*, *Antia N.J.*, *Harrison P.J.* The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part I // Crit. Rev. Microbiol. 1982. Vol. 10. N 4. P. 317–391.

5. *Antal T.K., Matorin D.N., Ilyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.I., Konyuhov I.V., Krendeleva T.E., Rubin A.B.* Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // Photosynth. Res. 2009. Vol. 102. N. 1. P. 67–76.

6. *Maxwell K.*, *Johnson G.* Chlorophyll fluorescence — a practical guide // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51. N 345. P. 659–668.

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

8. *Solovchenko A.*, *Gorelova O.*, *Selyakh I.*, *Pogosyan S.*, *Baulina O.*, *Semenova L.*, *Chivkunova O.*, *Voronova E.*, *Konyukhov I.*, *Scherbakov P.* A novel CO_2-tolerant symbiotic *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Desmodesmaceae): Acclimation to and performance at a high carbon dioxide level // Algal Res. 2015. Vol. 11. P. 399–410.

9. *Solovchenko A.*, *Pogosyan S.*, *Chivkunova O.*, *Selyakh I.*, *Semenova L.*, *Voronova E.*, *Scherbakov P.*, *Konyukhov I.*, *Chekanov K.*, *Kirpichnikov M.*, *Lobakova E.* Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel *Chlorella sorokiniana* strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence // Algal Res. 2014. Vol. 6. Part B. P. 234–241.

10. *Solovchenko A.*, *Merzlyak M.*, *Khozin-Goldberg I.*, *Cohen Z.*, *Boussiba S.* Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in Δ5 desaturase by nitrogen starvation and high light // J. Phycol. 2010. Vol. 46. N 4. P. 763–772.

11. *Rippka R.*, *Deruelles J.*, *Waterbury J. B.*, *Herdman M.*, *Stanier R. Y.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. 1979. Vol. 111. N 1. P. 1–61.

12. *Nagul E.A.*, *McKelvie I.D.*, *Worsfold P.*, *Kolev S.D.* The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: opening the black box // Analyt. Chim. Acta. 2015. Vol. 890. P. 60–82.

13. *Merzlyak M.N.*, *Naqvi K.R.* On recording the true absorption spectrum and the scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 2000. Vol. 58. N 2–3. P. 123–129.

14. *Solovchenko A.*, *Khozin-Goldberg I.*, *Cohen Z.*, *Merzlyak M.* Carotenoid-to-chlorophyll ratio as a proxy for assay of total fatty acids and arachidonic acid content in the green microalga *Parietochloris incisa* // J. Appl. Phycol. 2009. Vol. 21. N 3. P. 361–366.

15. *Merzlyak M.N.*, *Chivkunova O.B.*, *Maslova I.P.*, *Naqvi K.R.*, *Solovchenko A.E.*, *Klyachko-Gurvich G.L.* Light absorption and scattering by cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae // Russ. J. Plant Physiol. 2008. Vol. 55. N 3. P. 464–470.

16. *Aitchison P.*, *Butt V.* The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris* // J. Exp. Bot. 1973. Vol. 24. N 3. P. 497–510.

17. *Ruban A. V.* Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protection against photodamage // Plant Physiol. 2016. Vol. 170. N 4. P. 1903–1916.

18. *Horton P.* Developments in research on non-photochemical fluorescence quenching: Emergence of key ideas, theories and experimental approaches // Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria / Eds. B. Demmig-Adams, G. Garab,W. Adams III, and Govindjee. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. P. 73–95.

19. *Shibata K.* Dual wavelength scanning of leaves and tissues with opal glass // Biochim. Biophys. Acta. 1973. Vol. 304. N 2. P. 249–259.

Поступила в редакцию
20.04.2018

Принята к печати
04.06.2018

BIOPHYSICS

POSSIBILITIES OF OPTICAL MONITORING OF PHOSPHORUS STARVATION IN SUSPENSIONS OF THE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE)

A.G. Kuznetsov[1], S.I. Pogosyan[1], I.V. Konyukhov[1], S.G. Vasilieva[2], A.A. Lukyanov[2], V.S. Zotov[3], L. Nedbal[4], A.E. Solovchenko[2,5,*]

[1]Departments of Biophysics and [2]Departments of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119234, Moscow, Leninskiye Gory 1–12;
[3]Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Russia, 119071 Moscow, Leninskii Prospekt 33–2;
[4]Institute of Bio- and Geosciences 2: Plant Sciences (IBG-2), Forschungszentrum J lich (FZJ), Germany, 52428 Jülich, Leo-Brandt str;
[5]Euarsian Center for Food Security, Russia, 119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1–12
[*]e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Studies of the impact of inorganic phosphorus (P_i), an important nutrient, on the growth and physiological parameters of single-celled algae are important for investigations of the dynamics of phytoplankton abundance and productivity in natural ecosystems as well as in industrial systems for the cultivation of microalgae. Difficulties in carrying out such studies are associated with the complex kinetics of P_i uptake by and the ability of microalgae to store phosphorus in their cells. This situation necessitates the efficient methods for express monitoring of microalgal cultures such as the methods based on the registration of optical properties of cells, such as absorption and scattering of light and fluorescence of chlorophyll contained in the cells. Here, we describe the results of monitoring the cultures of a chlorophyte *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, starving for phosphorus. It was found that both optical (light absorption in the bands of the key pigments–chlorophylls and carotenoids) and luminescent (variable fluorescence of chlorophyll) parameters reflect closely the culture condition. The correction for the contribution of light scattering to the overall extinction of light by microalgal cell suspensions turned to be necessary. At the same time, the light scattering signal is an accurate measure of the total number of suspended particles in the suspension. However, it is difficult to monitor via optical absorption the samples with abundant light-scattering particles lacking the photosynthetic pigments (such as heterotrophic bacteria). For such cultures, the using of variable fluorescence-based parameter Fv/Fm reflecting the maximum photochemical efficiency of the photosystem II is advisable.

Keywords: *microalgae, light scattering, phosphorus starvation, chlorophyll fluorescence, photobioreactor, Chlorella vulgaris*

Сведения об авторах

Кузнецов Андрей Григорьевич – аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: 79257291630@yandex.ru

Погосян Сергей Иосифович – докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: pogosyan@biophys.msu.ru

Конюхов Иван Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vanka_kon@gmail.com

Васильева Светлана Геннадьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: vankat2009@mail.ru

Лукьянов Александр Андреевич – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: loockart@mail.ru

Зотов Василий Сергеевич – канд. биол. наук, руководитель группы ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: 8-495-952-33-09; e-mail: algo.consortium@gmail.com

Недбал Ладислав – доктор наук (Ph.D.), ст. исследователь, Институт биологии и геологии (IBG-2), Исследовательский центр Юлих (FZJ). Тел.: +49 2461 61-0; e-mail: l.nedbal@fz-juelich.de

Соловченко Алексей Евгеньевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, вед. науч. сотр. Евразийского центра по продовольственной безопасности МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru