В.В.Заваруев, А.Д.Апонасенко
Институт вычислительного моделирования СО РАН, г.Красноярск
В.Н.Лопатин
НИИ экологии рыбохозяйственных водоемов и наземных биосистем при Красноярском университете
С.В.Качин
Красноярский университет

УДК 535.8+551.463+577.472

ИССЛЕДОВАНИЯ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ФИТОПЛАНКТОНА С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ ОТКЛИКОМ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕГО МАКСИМАЛЬНОГО И СТАЦИОНАРНОГО ПАРАМЕТРОВ

Исследовано действие солей тяжелых металлов на величину максимальной и стационарной интенсивности флуоресценции водорослей. Показано различное влияние ионов меди, марганца и кобальта на эти параметры. Коэффициент фотосинтетической активности (КФА), рассчитанный по этим параметрам, коррелирует с концентрацией солей тяжелых металлов и физиологическим состоянием водорослей. Установлено, что природный фитопланктон в загрязненных районах имеет меньшее значение КФА, чем в экологически чистых участках.

The action of salts of heavy metals on values of maximal (F_{sim}) and stationary (F_{st}) of algae fluorescence intensity is investigated. The various influence of copper, manganese and cobalt ions on parameters F_{sim} and F_{st} is shown. Coefficient of photosynthetic activity (CPhA), designed on these parameters, correlates with concentration of heavy metals salts and physiological state of algae. It has been shown that natural phytoplankton in the polluted areas has smaller meaning CPhA, than in ecologically pure regions.

Сложноорганизованная система фотосинтеза интактной клетки водоросли адаптируется к условиям окружающей среды путем изменения структуры и активности фотосинтетических мембран. Адаптация происходит за счет изменения количества спаренных и неспаренных мембран в хлоропластах, увеличения или уменьшения активности реакционных центров и их количества; потоки поглощенной энергии между первой и второй фотосистемами перераспределяются, состав хлорофилл-белковых комплексов и липидный состав мембран меняется.

Важную роль в регулировании эффективности фотосинтеза у клеток фитопланктона при действии экологических факторов среды играют процессы изменения активности фотосистемы II (ФС II). Эта фотосистема

работает в чрезвычайно жестких условиях с образованием высокого окислительного потенциала и кислородных радикалов при окислении воды и, как было показано в многочисленных работах, обладает механизмом регуляции активности. Установлено, что квантовая эффективность ФС II альгологически чистых культур водорослей понижается при интенсивном освещении (фотоингибирование), низких концентрациях компонентов минерального питания, пониженных температурах и при действии антропогенных загрязнителей. Ингибирование активности проявляется в уменьшении квантового выхода ФС II и интенсивности компонента миллисекундной замедленной флуоресценции. В то же время фотосистема I (ФС I), связанная с циклическим транспортом электронов и восстановлением НАДФ, поражается только на поздних стадиях воздействия и обладает значительной устойчивостью к влиянию экологических факторов среды.

Квантовый выход флуоресценции ФС II (или как его еще называют коэффициент фотосинтетической активности):

$$F_V/F_M = (F_M - F_O)/F_M, \qquad (1)$$

где F_M и F_O – интенсивность флуоресценции фитопланктона при закрытых и открытых реакционных центрах. Формула (1) является общепринятой в мировой практике гидробиологических исследований.

Параметр F_O определяют двумя основными способами. Первый состоит в том, что начальное изменение интенсивности флуоресценции регистрируют сразу же после включения лампы. Временно́е разрешение должно быть меньше 1 мкс, чтобы зарегистрировать постоянный уровень свечения (F_O), что требует быстродействующих датчиков регистрации. При втором способе выдержанные в темноте клетки освещают импульсным светом от красного светодиода (3 мкс, 1 кГц). В этом случае имеется некоторая произвольность в выборе интенсивности возбуждающего света и, следовательно, величины интенсивности F_O.

Параметр F_M также можно измерить двумя способами: или кратковременным освещением светом с интенсивностью 500 Вт/м^2, или блокированием электронтранспортной цепи фотосинтеза каким-либо гербицидом, например диуроном.

Из сказанного следует, что при измерении параметра F_O исследователь сталкивается с затруднениями либо аппаратурного, либо методического плана. Вместо F_O иногда используется стационарный уровень флуоресценции (F_S), который достигается при регистрации медленной индукции флуоресценции фитопланктона. Время выхода на стационарный уровень и кривые, описывающие индукционный переход, для разных видов фитопланктона различны. Тем не менее, как показывает практика, время достижения стационарного уровня в среднем равно нескольким минутам.

После достижения стационарного уровня люминесценции F_S в пробу добавляется диурон до конечной концентрации 10^{-5} M и регистрируется максимальный уровень свечения F_M. Полученные таким образом параметры F_M и F_S используются для расчета коэффициента фотосинтетической активности:

$$F_V/F_M = (F_M - F_S)/F_M. \qquad (2)$$

Корректность использования такой формулы для определения фотосинтетической активности микроводорослей и для расчетов первичной продукции показана на природном фитопланктоне.

Применимость формулы (2) для определения действия токсичных веществ на активность фотосинтетического аппарата клеток и, следовательно, для мониторинга антропогенного воздействия на водные экосистемы не обоснована. В связи с этим целью настоящей работы было выявление корреляционных связей между параметром F_V/F_M и физиологическим состоянием фитопланктона в модельных экспериментах и в природной популяции.

Физиологическое состояние микроводорослей в лабораторной культуре изменяли путем добавления различных концентраций тяжелых металлов в суспензию клеток. При этом, как показано проведенными ранее исследованиями, в суспензии клеток наблюдаются изменения скорости роста, дыхания, синтеза пигментов и активности фотосинтеза.

Культуру Chlorella vulgaris Beijer выращивали в среде Тамия на люминостате на

постоянном свету при освещенности 35 Вт/м^2. Для экспериментов с тяжелыми металлами суспензию клеток отбирали в фазе экспоненциального роста. Тестировали тяжелые металлы (медь, марганец и кобальт) в форме солей: $CuSO_4$ H_2O; $MnCl_2$ $6H_2O$ и $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Сначала готовили 10-процентные растворы этих солей, а затем к 50 мл суспензии клеток добавляли 10, 100 и 1000 мкл исходного раствора. Контролем служила культура водорослей без каких-либо добавок. Измерения величины интенсивности флуоресценции F_M и F_S проводили через 20, 40 и 60 мин после добавления солей в культуру водорослей.

Изменение параметра F_V/F_M, рассчитанного по формуле (2), представлено в таблице. Все тестируемые соли тяжелых металлов уменьшали коэффициент фотосинтетической активности (КФА) водорослей. Спад активности наиболее отчетливо проявлялся через 60 мин инкубации. Это говорит о том, что воздействие ионов тяжелых металлов происходит не подобно действию гербицидов, а через метаболические реакции, отдаленные от световой стадии фотосинтетических процессов.

Из таблицы видно, что ионы меди в концентрации 5,6 мг/л уже через час уменьшают КФА почти в 2 раза. Однако это не предел чувствительности клеток Ch.vulgaris к данному металлу. При культивировании хлореллы в присутствии ионов меди в течение нескольких суток их действие на ростовые характеристики культуры проявляется при концентрациях 0,05 мг/л. Более токсичны соли меди к синезеленым водорослям.

Действие солей тяжелых металлов на стационарный и максимальный уровни флуоресценции различны. Для ионов меди временна́я динамика изменения этих параметров выражается в их непрерывном уменьшении, причем F_M падает быстрее, чем F_S Для ионов марганца и кобальта F_S возрастает со временем, а F_M медленно снижается.

Достоверное уменьшение параметра F_V/F_M после инкубации в течение часа наблюдалось при разных концентрациях ионов металлов. В ряду токсичности тестируемые соли можно расположить в следующей последовательности:

$$CuSO_4 \ \ H_2O > MnCl_2 \ \ 6H_2O >$$

$$> Co(NO_3)_2 \ \ 6H_2O.$$

Из представленных результатов видно, что при данной постановке экспериментов и в пределах чувствительности клеток хлореллы к тестируемым веществам величина КФА тем меньше, чем выше концентрация солей тяжелых металлов.

Изменение параметра $(F_M - F_S)/F_M$ в зависимости от времени инкубации при различных концентрациях ионов меди, марганца и кобальта (эксперименты 1, 2 и 3 соответственно)

Эксперимент	Концентрация ионов в пробе, %	Время инкубации, мин		
		20	40	60
1	Контроль	0,61 ± 0,02	0,62 ± 0,02	0,62 ± 0,02
	0,002	0,51 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,36 ± 0,04
	0,02	0,31 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01
	0,2	0,30 ± 0,05	0,19 ± 0,06	0
2	Контроль	0,65 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,63 ± 0,03
	0,002	0,65 ± 0,03	0,63 ± 0,04	0,65 ± 0,03
	0,02 %	0,60 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,49 ± 0,04
	0,2 %	0,56 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,42 ± 0,03
3	Контроль	0,66 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,65 ± 0,03
	0,002 %	0,65 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,63 ± 0,04
	0,02 %	0,64 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,61 ± 0,03
	0,2 %	0,64 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,45 ± 0,04

Изучение характера изменения КФА природной популяции водорослей в районах, подверженных и не подверженных загрязнению токсическими веществами, включая тяжелые металлы, показало следующее. На расстояниях до 100 м от газоразведочной скважины наблюдается снижение концентрации фитопланктона, что может быть связано с его разрушением в результате работы буровой платформы. В районе бурения происходит снижение КФА фитопланктона. Размер зоны, в которой наблюдается угнетение фотосинтетических процессов водорослей, определяется антропогенным фактором и гидрологической ситуацией: в период стагнации ингибирование фотосинтеза происходит на более значительных расстояниях, чем в период вертикального и горизонтального движения водных масс.

Исследования выполнены в рамках проекта № 02.01.167 «Разработка методов и аппаратуры для оперативного контроля (мониторинга) состояния водных экосистем».