



Е. С. Соломонова, вед. ин., А. И. Акимов, н.с.

Институт биологии южных морей им А.О.Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ *CHLORELLA VULGARIS SUBOBLONGA* МЕТОДАМИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ПЕРЕМЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Исследована возможность применения диацетат флуоресцеина (FDA) (проточная цитометрия) и коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла (K) для экспресс-оценки функционального состояния водоросли *Chlorella vulgaris suboblunga* в условиях накопительной культуры. Между величиной K и скоростью роста (μ) отмечается положительная корреляция ($r^2 = 0.9$). Наблюдалась высокая скорость восстановления (менее суток) данного показателя при улучшении условий культивирования. Параметр FDA_{fl} напротив, устойчив к факторам, обратимо лимитирующим рост водорослей в культуре, при условии, если уровень этих факторов не приводит к необратимой деструкции клеток. Величина FDA_{fl} может служить индикатором летальных воздействий на клетки водорослей. Восстановление этого параметра зависит от скорости регенерации нового клеточного материала, которая связана с интенсивностью света при росте клеток.

Ключевые слова: накопительная культура, скорость роста, проточная цитометрия, коэффициент переменной флуоресценции, диацетат флуоресцеина, ферментативная активность, фермент эстераза.

В практике гидробиологических исследований существует ряд методов, позволяющих определять функциональную активность фитопланктона на основании измерения продукционных характеристик, таких как скорость роста или фотосинтез при определённых условиях. Однако такие измерения, как правило, трудоёмки и длительны по времени. Существуют также косвенные методы определения функциональной активности водорослей, основанные на определении скоростей отдельных биохимических или фотосинтетических реакций.

Биохимический подход основан на применении витальных красителей – маркёров, позволяющих распознавать физиологически активные и неактивные клетки микроводорослей. В одном из таких методов при исследовании культур микроводорослей и природного фитопланктона широко применяется диацетат флуоресцеина (FDA). В состав FDA входит субстрат, специфичный к ферментам группы эстераз [6]. Его ферментный гидролиз приводит к высвобождению молекулы флуоресцеина и, как следствие, свечению клетки (эмиссия в зелёной области спектра). Таким образом, FDA является маркёром ферментативной активности в живых клетках, а интенсивность его флуоресценции

пропорциональна физиологической активности каждой из исследуемых клеток [5]. Однако применение витальных красителей не всегда оказывается эффективным, например, для диатомовых водорослей получены плохо воспроизводимые и случайные результаты [4, 9, 16].

Второй подход – биофизический, в частности исследование флуоресцентных параметров водорослей. Теоретически разработаны и используются методы переменной флуоресценции, которые связаны с изменением выхода флуоресценции хлорофилла до и после полной загрузки реакционных центров второй фотосистемы (РЦ ФС2) с помощью мощных световых импульсов или же их ингибирования с помощью ДЦМУ [3-(3, 4 dichlorophenyl) 1, 1-dimethylurea]. Считается, что эти изменения выхода флуоресценции пропорциональны той части энергии света, которая используется в фотохимических реакциях фотосинтеза. Для предварительно адаптированных к темноте водорослей это соответствует потенциально возможной эффективности утилизации световой энергии [7, 8, 14].

Рассмотренные выше подходы являются относительно новыми в практике гидробиологических

исследований и позволяют изучать отдельные стороны функциональной активности водорослей.

Цель данной работы: исследовать с помощью указанных методов функциональную активность культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* в различных условиях роста.

Материал и методы. Культура *Chlorella vulgaris suboblonga* из коллекции отдела экологической физиологии водорослей Института биологии южных морей НАН Украины выращивали на среде f/2 в колбах объёмом 500 мл при освещении люминесцентными лампами ЛДЦ-30. Уровень освещённости измеряли люксметром Ю-116, принимая 1 клк = 17.2 мкЕ м⁻² с⁻¹ [3]. Накопительную культуру выращивали при постоянном свете 43 мкЕ м⁻² с⁻¹, затем после разведения переставляли на три освещённости 250, 50 и 20 мкЕ м⁻² с⁻¹. Температура поддерживалась в диапазоне 18 – 20° С.

Для цитометрического анализа из культивируемых сосудов отбирали пробы объёмом 3 мл. Для оценки доли физиологически активных клеток в культурах использовали диацетат флуоресцеина (максимумы возбуждения и эмиссии соответственно 494 и 518 нм). Рабочий раствор красителя готовили в диметилсульфоксиде (DMSO) (конечная концентрация 5 мг мл⁻¹) и хранили при +4°С в замороженном состоянии (температура плавления DMSO +18.5°С). Окраску суспензии клеток проводили по [6]. После оттаивания красителя при комнатной температуре его медленно добавляли в интенсивно перемешиваемую пробу в количестве 1 мкл мл⁻¹. Окраску производили в темноте в течение 20 мин (для выбора оптимального времени предварительно проводили тестовые окраски от 3 до 55 мин). Неокрашенные и окрашенные FDA пробы культур исследовали с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения СХР.

Общую численность микроводорослей определяли в кластере на 2 параметрических цитограммах по прямому светорассеиванию (FS) и флуоресценции отдельных клеток в красной области спектра (FL4) на безразмерных логарифмических шкалах. Концентрацию клеток рассчитывали по скорости протока пробы (60 мкл мин⁻¹), времени счёта (100 – 360 с) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (минимум 3000 кл. для каждой из проб). Контроль качества измерений производили с помощью калибровочных

флуоросфер (Flow-Check™, Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

Ферментативную активность и содержание пигментов в клетках оценивали на 2 параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (канал FL1 в зелёной области спектра, 525 нм) и автофлуоресценции (FL4 в красной области спектра, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Рассчитывали среднее значения FDA флуоресценции на клетку и обозначили её, как FDA_{fl} .

Переменная флуоресценция определялась как разница между интенсивностью флуоресценции хлорофилла при закрытых и открытых реакционных центрах ФС2: $Fv = Fm - F_0$, где Fm и F_0 интенсивности флуоресценции при закрытых и открытых реакционных центрах соответственно. Мы использовали нормированный коэффициент переменной флуоресценции $K = (Fv + F_0) / F_0$, который равен единице при отсутствии переменной флуоресценции (например, мёртвые клетки или экстракты хлорофилла) и больше двух при хорошем физиологическом состоянии водорослей. Методика и техническая реализация метода описаны нами ранее [2].

Удельную скорость роста μ определяли по изменению численности микроводорослей в ходе эксперимента в соответствии с общепринятой формулой:

$$\mu = \frac{\log N - \log N_0}{\Delta t}$$

где N и N_0 – конечная и начальная численности клеток, Δt – время между измерениями в сутках.

Результаты. Максимальные значения общей численности и удельная скорость роста (μ) накопительной культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* наблюдались в экспоненциальной фазе роста, на 2 – 3-и сутки эксперимента, после лаг-периода, связанного с сильным разведением культуры (рис. 1). Затем наблюдалось быстрое падение скорости роста μ водорослей и коэффициента переменной флуоресценции K . Значения FDA_{fl} оставались высокими до наступления стационарной фазы роста (рис. 2).

По мере развития стационарной фазы (старение культуры) на фоне снижения концентрации клеток происходило более быстрое падение показателя FDA_{fl} , однако не столь значительное, как для параметров K и μ соответственно.

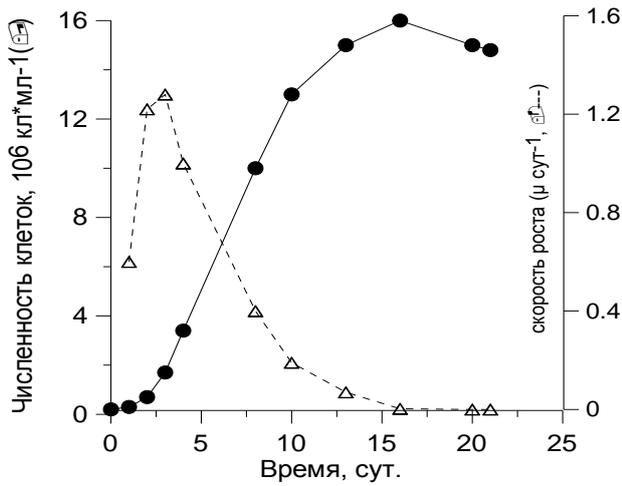


Рис. 1 Динамика общей численности (●), удельной скорости роста (Δ - - -) в накопительной культуре *Chlorella vulgaris suboblonga*
 Fig. 1 Dynamics of the total abundance (●), specific growth rate (Δ - - -) in the batch microalgal cultures

Между скоростью роста водорослей и коэффициентом переменной флуоресценции наблюдается положительная корреляционная

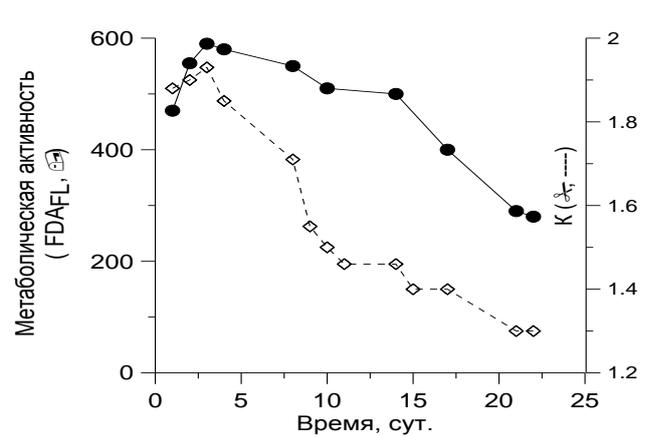
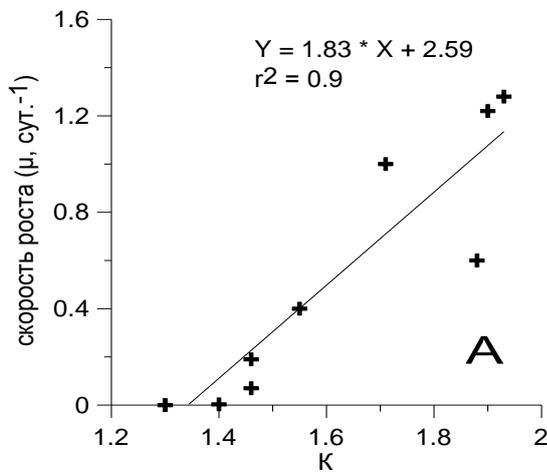


Рис. 2 Изменение показателя метаболической активности FDA_{fl} (●) и коэффициента переменной флуоресценции K (◇ - - -) в накопительной культуре *Chlorella vulgaris suboblonga*
 Fig. 2 Changing of the metabolite activity FDA_{fl} parameter (●) and coefficient of variable fluorescence K (◇ - - -) in the batch microalgal culture *Chlorella vulgaris suboblonga*

связь ($r = 0.9$, рис. 3а) Достоверной связи между удельной скоростью роста и FDA_{fl} не наблюдалось (рис. 3б).

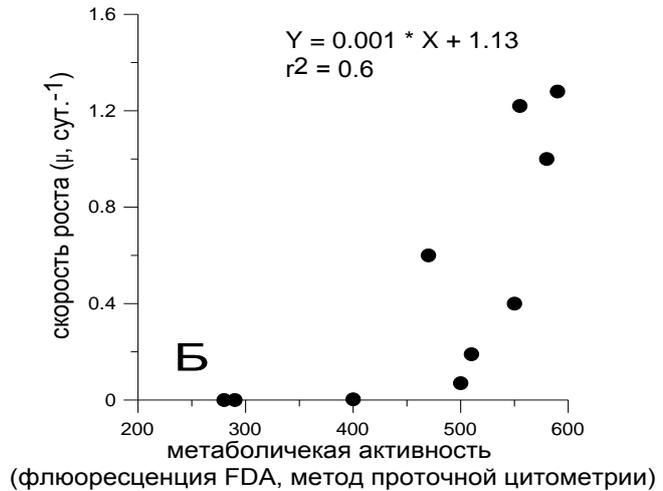


Рис. 3 Взаимосвязь скорости роста μ (сут. $^{-1}$) и коэффициента переменной флуоресценции (А); скорости роста и метаболической активности FDA_{fl} в накопительной культуре (Б)
 Fig. 3 Relationship of specific growth rate μ (d. $^{-1}$) and coefficient of variable fluorescence K (A), specific growth rate μ and the metabolite activity FDA_{fl} (B)

После разведения стационарной культуры свежей средой примерно в 20 раз наблюдали рост водорослей и динамику параметров K и FDA_{fl} на трёх освещённостях: насыщающей фотосинтез ($250 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) и двух лимитирующих ($50 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и $20 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) (рис. 4).

Как видно из данных рис. 4, водоросли достигли стационарной фазы на $250 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, при $50 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ находились близко к стационарной фазе, при $20 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ – в экспоненциальной фазе роста.

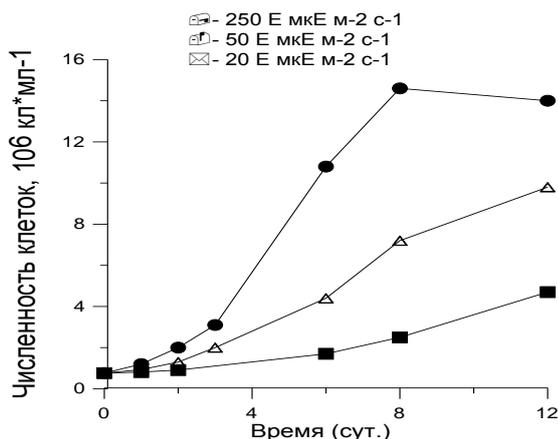


Рис. 4 Численность клеток культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* при трёх уровнях освещенности
 Fig. 4 Dynamics of the total abundance microalgal cultures *Chlorella vulgaris suboblonga* at three levels of irradiation

Динамику изменения FDA_{fl} , коэффициента переменной флуоресценции K и скорости роста μ (сут.⁻¹) непосредственно после разведения стационарной культуры иллюстрирует рис. 5. Наиболее быстрое восстановление удельной скорости роста водорослей происходило в условиях высокой освещённости, а максимальные значения наблюдались на 1 – 2-е сутки; на освещённости 50 мкЕ м⁻²с⁻¹ экспоненциальный рост отмечали на 3 сутки, а в условиях сильного светового лимитирования (20 мкЕ м⁻²с⁻¹) – на 7 – 8-е сутки.

Коэффициент переменной флуоресценции K достигал максимальных значений в течение первых суток после разведения на 20 и 50 мкЕ м⁻²с⁻¹ и на вторые сутки при интенсивности света 250 мкЕ м⁻²с⁻¹. При дальнейшем росте культур наблюдались изменения показателя K и скорости деления μ соответственно фазам роста культур: быстрое снижение при 250 мкЕ м⁻²с⁻¹, более медленное при 50 мкЕ м⁻²с⁻¹ и его отсутствие при 20 мкЕ м⁻²с⁻¹.

Восстановление FDA_{fl} запаздывает по отношению к росту других исследуемых параметров. Наиболее быстрый рост FDA_{fl} наблюдался при 250 мкЕ м⁻²с⁻¹. При этой интенсивности света максимум FDA активности достигается на 4-е сутки, а на двух других освещённостях примерно на 8-е. Во всех опытах наблюдается лаг-фаза в течение первых двух

суток после изменения условий. После разбавления стационарной культуры свежей питательной средой значения FDA флуоресценции остаются высокими в течение эксперимента, с тенденцией к снижению в условиях стационарной фазы при 250 мкЕ м⁻²с⁻¹ и повышению в экспоненциальной фазе при 20 мкЕ м⁻²с⁻¹.

Как и в случае исходной, накопительной культуры наблюдается положительная корреляция между значениями скорости роста и коэффициентом переменной флуоресценции K рис. 6

Обсуждение. Рассматриваемые параметры представляют разные стороны функциональной активности водорослей. Переменная флуоресценция отражает эффективность самых первых стадий трансформации света в химическую энергию макроэргических связей. FDA флуоресценция показывает активность ферментов группы эсетраз, которые участвуют в более поздних стадиях преобразования запасённой химической энергии.

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой чувствительности переменной флуоресценции к факторам, ингибирующим рост водорослей в накопительной культуре. Снижение этого параметра происходит после выхода исследуемой популяции из экспоненциальной фазы роста и падает до значений 1.2 при нулевых значениях скорости роста. Эти значения больше единицы (как при полностью ингибированных реакционных центрах), что указывает на продолжающийся процесс утилизации световой энергии, хотя и с низкой эффективностью.

В накопительном режиме роста водорослей увеличение концентрации клеток происходит на фоне снижения концентрации питательных веществ в среде, которые приводят к лимитированию фотосинтеза и удельной скорости роста. В этой связи отметим, что характер наблюдаемых изменений величины переменной флуоресценции аналогичен тем, которые отмечаются в литературе в экспериментах при дефиците биогенных элементов в среде.

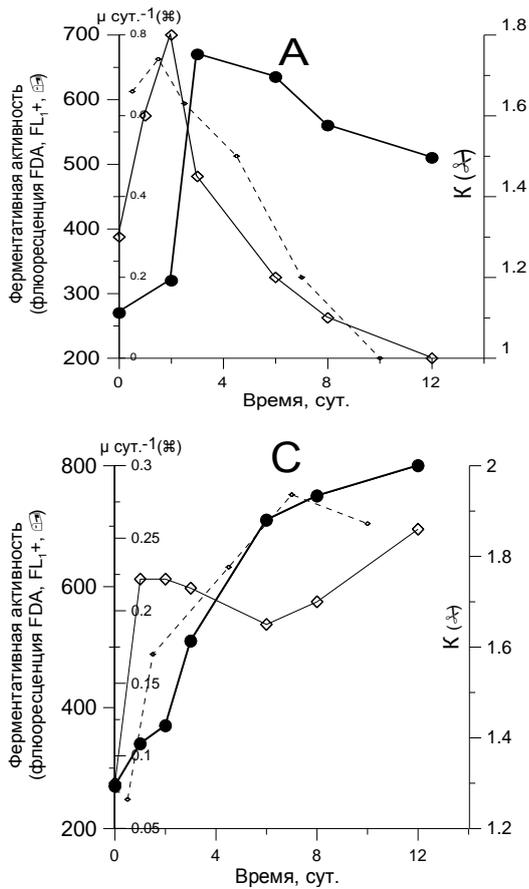


Рис. 6 Зависимость показателей удельной скорости роста водорослей μ (сут.⁻¹) и коэффициента переменной флуоресценции K для интенсивности света 250 мкЕ м⁻²с⁻¹ (●), 50 мкЕ м⁻²с⁻¹ (Δ)
 Fig. 6 Relationship of specific growth rate μ (d.⁻¹), coefficient of variable fluorescence K for irradiance of 250 мкЕ м⁻²с⁻¹ (●), 50 мкЕ м⁻²с⁻¹ (Δ)

В ряде работ показано, что уровень обеспеченности биогенами влияет на величину переменной флуоресценции и эффективности работы ФС2. В частности отмечается падение показателя переменной флуоресценции при недостатке минерального азота в среде для культур водорослей и природных популяций [12, 13], и железа для природных популяций [11]. После перенесения водорослей в свежую питательную среду f/2 происходит быстрое восстановление работы ФС2. Скорость роста также возрастает, однако с некоторым запозданием по отношению к переменной флуорес-

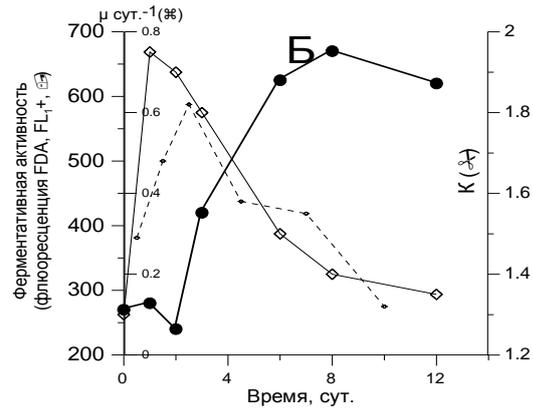
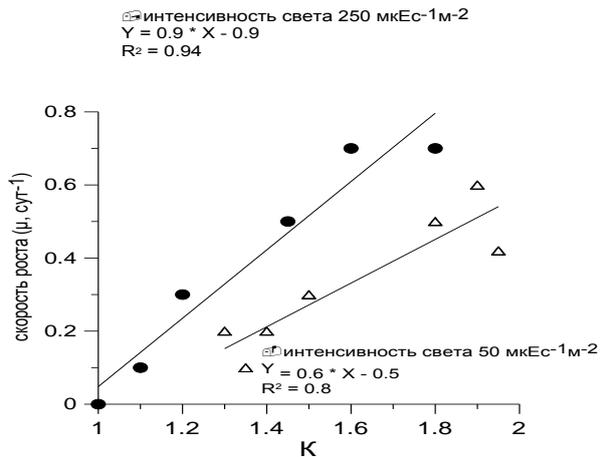


Рис. 5 Показатели удельной скорости роста μ (*---*---), относительной ферментативной активности FDA_f (●) и коэффициента переменной флуоресценции K (◇) *Chlorella vulgaris suboblunga*, адаптированной к интенсивности света равной 250 (А), 50 (Б) и 20 мкЕ м⁻²с⁻¹ (С)
 Fig.5 Parameters of specific growth rate μ (*---*---), metabolite activity FDA_f parameter (●) and coefficient of variable fluorescence K (◇) in *Chlorella vulgaris suboblunga* at the irradiation of 250 мкЕ м⁻²с⁻¹ (А), 50 мкЕ м⁻²с⁻¹ (Б) и 20 мкЕ м⁻²с⁻¹ (С)



ценции. Это соответствует последовательности событий – сначала восстановление эффективности фотосинтеза, затем рост клеток. Аналогичная закономерность наблюдалась в частности для *Thalassiosira weissflogii*, где росту клеток предшествует увеличение переменной флуоресценции [1]. Характер динамики и быстрота восстановления переменной флуоресценции и скорости роста позволяют сделать заключение, что после улучшений условий наблюдается быстрое восстановление активности реакционных центров ФС2 и роста водорослей (рис. 5).

Принципиально другой характер изменений наблюдался нами при измерении активности ферментов группы эстераз. Факторы, приводящие к снижению скорости роста и коэффициента переменной флуоресценции, в условиях накопительного роста мало влияли на активность этих ферментов, хотя некоторое воздействие условий стационарного состояния все же наблюдалось. Максимальное снижение удельной ферментативной активности (всего в 2 раза) отмечено при существенном старении культуры, когда происходило снижение общей концентрации клеток, вероятно, вследствие лизиса (рис. 2). Аналогичные результаты были получены [9], когда наблюдали падение ферментативной активности клеток *Thalassiosira weissflogii*, адаптированной к различным температурным и световым условиям, после выхода культуры в стационарную фазу роста.

После разведения культуры на всех освещённостях наблюдался двухсуточный лаг-период, после которого удельная ферментная активность возрастала примерно в те же 2 раза, во сколько она упала в исходной накопительной культуре. Скорость восстановления функциональной активности исследуемой культуры зависела от уровня заданной освещённости: при интенсивности света $250 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ наблюдали увеличение флуоресценции FDA на 2 – 3 сутки, тогда как при $20 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ – на 5 – 7 сутки. В проводимых опытах хорошо видна устойчивость величины FDA_{fl} после периода восстановления. Во всём диапазоне изменения

плотности культур (и при переходе к стационарному состоянию) отмечалось незначительные изменения FDA_{fl} , которые соответствуют степени развития стационарного состояния: понижение при $250 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и повышение при $20 \text{ мкЕ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (рис. 5). Таким образом, FDA_{fl} , как показатель ферментативной активности, не коррелирует с теми функциональными изменениями, которые связаны с возрастом культуры и скоростью роста, если при этом не наблюдается необратимой деструкции клеток. Нам представляется что величине FDA_{fl} может служить индикатором летальных воздействий на клетки водорослей и оценки соотношения живых и мёртвых клеток в популяции, что согласуется с литературными данными [10, 15, 16].

Выводы: 1. Полученные в работе результаты показывают, что применяемые нами методы позволяют характеризовать различные стороны состояния водорослей. 2. Переменная флуоресценция является величиной тесно связанной со скоростью роста водорослей и является чувствительным индикатором функционального состояния микроводорослей. 3. Величина переменной флуоресценции быстро восстанавливается после периода неблагоприятных условий, если водоросли при этом не теряли своей жизнеспособности. 4. FDA флуоресценция является более консервативным параметром, его заметные изменения наблюдаются в условиях необратимой потери функциональной активности клеток и их гибели.

1. Запара Е. В., Осипов В. А. Динамика флуоресцентных параметров диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* в зависимости от источника азота в условиях дефицита световой энергии // Человечество и окружающая природа: Международная научно-практич. конф. – М.: МГУ, 2004. – С. 432 – 433 с.
2. Стельмах Л. В., Куфтаркова Е. А., Акимов И. А., Бабич И. И., Кожемяка А. Б. Использование переменной флуоресценции хлорофилла *in vivo* для оценки функционального состояния фитопланктона // Система контроля окружающей среды. – 2010. – 13. – С. 263 – 268.
3. Парсонс Т. Р., Такахаши М., Харгрейв Б. Биологическая океанография. – М.: Лёгкая пром-сть, 1982. – 432 с
4. Agustí S, Sánchez MC. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe // *Limnol Oceanogr.* – 2002. – 47. – P. 818 – 828.
5. Brookes J. D., Geary S. M., Ganf G. G., Burch M. D. Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton // *Mar. Freshw. Res.* – 2000. – 51. – P. 817 – 823.
6. Dorsey J., Yentsch C. M., Mayo S., McKenna C. Rapid analytical technique for the assessment of

- cell activity in marine microalgae. // Cytometry. – 1989. – **10**. – P. 622 – 628.
7. *Falkowski P. G., Kolber Z.* Variations in Chlorophyll Fluorescence Yields in Phytoplankton in the World Oceans // Australian Journal of Plant Physiology. - 1995. – **22**, 2. – P. 341 – 355.
 8. *Falkowski P., Kiefer D.A.* Chlorophyll *a* fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass // Journal of Plankton Research. – 1985. – **7**, 5. – P. 715 – 731.
 9. *Garvey M., Moriceau B., Passow U.* Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions. // Mar Ecol Prog Ser. – 2007. – **352**. – P. 17 – 26.
 10. *Gilbert F, Galgani F, Cadiou Y.* Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. // Mar Biol. – 1992. – **112**. P. 199–205.
 11. *Greene R. M., Kolber Z. S., Swift D. G., Tindale N. W., Falkowski P.* Physiological limitation of phytoplankton photosynthesis in the eastern equatorial Pacific determined from variability in the quantum yield of fluorescence // Limnol. Oceanogr. – 1994. – **39**. – P. 1061 – 1074.
 12. *Kirchman D.L.* Phytoplankton death in the sea. // Nature. – 1999. – **398**. – P. 293 – 294.
 13. *Kolber Z. S., Zehr J., Falkowski P. G.* Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem 2. // Plant Physiol. – 1988. – **88**. – P. 905 – 918.
 14. *Krause G.H., Weis H.* Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1991. – **42**. – P. 313 – 349.
 15. *M. Llabrés, S. Agustí.* Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: evidence for Atlantic communities. // Limnology and Oceanography. – 2006. – **51**, 1. – P. 21 – 29.
 16. *Onji M., Sawabe T., Ezura Y.* An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. // Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ. – 2000. – **51**. – P. 151 – 158.

Поступила 11 янвря 2012 г.

Оцінка функціонального стану культури *Chlorella vulgaris suboblonga* методами проточної цитометрії та змінної флуоресценції. К. С. Соломонова, А. І. Акімов. Досліджували можливість застосування діацетату флуоресцеїну (FDA) (проточна цитометрія) та коефіцієнта змінної флуоресценції хлорофілу (K) для експрес-оцінки функціонального стану водорості *Chlorella vulgaris suboblonga* в умовах накопичувальної культури. Між величиною K і швидкістю росту (μ) відзначається позитивна кореляція ($r^2 = 0.9$). Спостерігалася висока швидкість відновлення (менше доби) цього показника при поліпшенні умов культивування. Параметр FDA_{fl} навпроти стійкий до чинників, що оборотно лімітують ріст водоростей в культурі, за умови, якщо рівень цих чинників не призводить до безповоротної деструкції клітин. Величина FDA_{fl} може служити індикатором летальних дій на клітини водоростей. Відновлення цього параметра залежить від швидкості регенерації нового клітинного матеріалу, яка пов'язана з інтенсивністю світла при рості клітин.

Ключові слова: накопичувальна культура, швидкість росту, проточна цитометрія, коефіцієнт змінної флуоресценції, діацетат флуоресцеїну, ферментативна активність, фермент естераза.

The assessment of functional status of *Chlorella vulgaris suboblonga* by flow cytometry and variable fluorescence. E. S. Solomonova, A. I. Akimov. The possibility of using diacetat fluorescein (FDA) (flow cytometry) and the coefficient of the variable fluorescence (K) for estimated of the functional state of the algae *Chlorella vulgaris suboblonga* in the batch cultures were investigated. The positive correlation ($r^2 = 0.9$) between K, and the growth rate were observed. The high rate of restoration (less than a day) this parameter at the improving of the conditions were observed. The parameter FDA_{fl} opposite resistant to the factors, that limiting the growth of algae, on condition that the level of these factors doesn't lead to destruction of cells. The value FDA_{fl} can serve as an indicator of lethal effects on algae cells. The recovery of this parameter depends on the rate of regeneration a new cellular material, depended on the intensity of light.

Key words: batch culture, growth rate, flow cytometry, the coefficient of the variable fluorescence, fluorescein diacetate, the enzymatic activity, enzyme esterase.