

ПРОВ 2010

ПРОВ 98

АКАДЕМИЯ НАУК УССР

Институт биологии южных морей

УДК 581.526.325:681.2 262.5 .

21.05.86

№ 3696- В 86

О.А.Юнев, В.Л.Владимиров, Н.В.Салдан, Н.Н.Доля

ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА "А" IN VIVO И
IN SITU ИМПУЛЬСНЫМ ЗОНДИРУЮЩИМ ФЛУОРИМЕТРОМ

Институт биологии
южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 63 деп.

Севастополь - 1986

В последние годы в океанографических исследованиях все шире используется определение хлорофилла непосредственно в морской воде с помощью различной флуориметрической техники [2]. Вместе с тем известно, что интенсивность флуоресценции хлорофилла *in vivo* и *in situ* зависит от вариаций в таксономическом составе, физиологического состояния фитопланктона и некоторых физических и химических факторов среды, что затрудняет интерпретацию результатов флуоресцентного зондирования [7,9,10].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось: 1) исследование связи между флуоресценцией отдельных видов морских планктонных водорослей и концентрацией хлорофилла и 2) оценка статистической взаимосвязи между флуоресценцией *in situ* и концентрацией хлорофилла в Черном море.

Материал, аппаратура и методика измерений

Определение удельной флуоресценции хлорофилла ($УФХ$) - отношения флуоресценции на единицу хлорофилла, у отдельных планктонных водорослей проводили на 20 видах, которые включали: 5 диатомовых, 5 пиррофитовых, 3 золотистые, 2 зеленые и 5 мелких жгутиковых (вид последних не был определен). Водоросли были любезно предоставлены Л.А.Ланской и О.А.Галатоновой и выращивались при оптимальных условиях минерального питания, освещенности и температуры [3]. Измерение флуоресценции проводили в логарифмической фазе роста культур.

Корреляционная зависимость флуоресценции *in situ* и концентрации хлорофилла в морской воде оценивалась для района Черного моря, расположенного между 29° и 34° в.д.. Часть станций располагалось в открытом море, а часть - у берегов Крыма.

и Румынии. Исследования проводились в Черноморском этапе 43 рейса НИС "Михаил Ломоносов" с 5 по 20 сентября 1984 г.

Флуоресценцию хлорофилла *in vivo* и *in situ* измеряли с помощью разработанного и изготовленного в отделе оптики МГИ АН СССР макета импульсного зондирующего флуориметра, созданного на базе простого флуориметра для измерения флуоресценции на ходу через сквозную шахту в днище судна [1]. Оптическая схема прибора осталась без изменений, флуоресценция измеряется под углом 90° к возбуждающему потоку. Спектральный диапазон осветителя (380-540 нм) определяется светофильтром СЗС-22, спектральный диапазон измерительной схемы (660-730 нм) определяется светофильтром КС-18 и фотоумножителем ФЭУ-79. Рабочий объем, в котором измеряется флуоресценция, равен приблизительно 4 см^3 . В качестве источника света использована импульсная лампа ИСП-5, обладающая хорошей стабильностью как интенсивности вспышек во времени, так и положением разряда между электродами.

Конструктивно прибор размещен в том же корпусе и состоит из трех герметических контейнеров, в которых расположены: осветитель, измерительный блок, блок питания и канал измерения глубины. Но, в отличие от предыдущей модели, зондирующий флуориметр имеет световую ловушку, исключающую влияние дневного света и позволяющую проводить измерения не только *in situ*, но *in vivo* в лаборатории или на палубе судна.

Электронная схема флуориметра собрана по схеме импульсного фотометра прямого отсчета, дискретность измерений 0,2 с. Для измерения глубины погружения в приборе установлен вибрационный датчик давления типа ДДВ-20. Прибор рассчитан на ра-

боту с трехжильным кабель-тросом (четырежильным кабелем).

Сигнал флуоресценции передается на борт судна в аналоговом виде, глубины - в частотном. Сигнал регистрируется на двухкоординатном самопишущем потенциометре, а при необходимости - в цифровой форме на перфраторе ПЛ-80.

Прибор имеет следующие основные технические характеристики:

- диапазон измерения (по концентрации хлорофилла) - $0,03 - 5,0 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$
- максимальная глубина погружения - 300 м
- среднеквадратическая погрешность измерения флуоресценции - 5%
- среднеквадратическая погрешность измерения глубины - 1%
- долговременная стабильность рабочей характеристики (за четыре месяца) - 15%
- потребляемая мощность - 15 ватт.

Измерение концентрации хлорофилла "а" и отдельно продуктов его разрушения (феофитина "а" + феофобрида "а") проводили экстрактным флуориметрическим методом [4]. Для этих целей был использован лабораторный флуориметр, собранный на базе флуориметрической приставки спектроколориметра "Спекол".

Отбор проб для определения концентрации пигмента осуществляли 6-литровым пластиковым батометром проточного типа или касетой батометров "Исток-5". Выбор горизонтов, с которых отбирали пробы морской воды, производили по профилям флуоресценции или температуры.

Для обработки и оценки результатов исследования были использованы общепринятые статистические формулы и критерии [12]. Относительная погрешность измерений оценивалась на уровне 26%.

Р е з у л ь т а т ы

Опыты *in vivo* . На рисунке представлены кривые, отражающие зависимость флуоресценции от концентрации хлорофилла у различных типов планктонных водорослей. Как видно из рисунка, линейная зависимость между флуоресценцией и концентрацией в основном соблюдается до концентрации пигмента меньше приблизительно $1,5 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$. Это связано с тем, что при больших световых потоках (высокие концентрации хлорофилла) световая характеристика прибора становится нелинейной. Кроме этого, значительная доля возбуждающего света не достигает рабочего объёма из-за рассеяния света клетками фитопланктона. Однако, основной целью при разработке флуориметра было получение максимальной чувствительности для работы в открытых районах океана, где концентрация хлорофилла составляет сотые и десятые доли $\text{мкг} \times \text{л}^{-1}$ и поэтому, отклонение от линейности при высоких концентрациях пигмента в нашей работе можно считать фактом несущественным.

Величины УФХ как в случае одного типа, так и при рассмотрении совокупности всех исследованных водорослей отличаются между собой приблизительно в 4 раза (табл. I). Исключение составляют золотистые - у которых отношение максимальной УФХ к минимальной равно 11,5. Таким образом, вариации УФХ у различных планктонных водорослей настолько велики, что выразить связь флуоресценции *in vivo* и концентрации хлорофилла одним уравнением линейной регрессии даже для отдельного типа водорослей не представляется возможным. Также не проявилась связь между УФХ и размерами клеток (табл. I).

Таблица I

Удельная флуоресценция хлорофилла планктонных водорослей (опыты in vivo)

Водоросли	Средний объём клетки, мкм^3	УФХ отн.ед.
1	2	3
Пирофитовые		
1. <i>Gymnodinium splendens</i>	62172	0,63
2. <i>Prorocentrum micans</i>	8792	0,45
3. <i>Gyrodinium fissum</i>	5275	0,63
4. <i>Exuviaella cordata</i>	835	1,35
5. <i>Gymnodinium kovalévski</i>	484	1,70
Диатомовые		
6. <i>Thalassiosira parva</i>	4200	0,61
7. <i>Leptocyn drus minimus</i>	2600	0,82
8. <i>Chaetoceros insignis</i>	1500	0,82
9. <i>Skeletonema costatum</i>	600	0,52
10. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18	1,90
Золотистые		
11. <i>Olishadiscus luteri</i>	420	0,39
12. <i>Pontosphaera huxlei</i>	49	1,31
13. <i>Monohrasis luteri</i>	14	4,50
Зеленые		
14. <i>Platymonas viridis</i>	276	0,78
15. <i>Dunaliella salina</i>	119	0,54

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Мелкие жгутиковые		
16. Черное море, ¹⁾ Севастопольская бухта	5	0,93
17. Черное море, 10 миль от Севастополя, 1980 г.	5	1,55
18. Черное море, 10 миль от Севастополя, 1981 г.	5	1,17
19. Индийский океан, №1	5	0,45
20. Индийский океан, №2	5	1,33

1) - указано место, откуда взята проба для культивирования водорослей.

Натурные исследования. Во время экспедиции на борту НИС "Михаил Ломоносов" прежде всего было проверено соответствие флуоресценции *in situ*, получаемой при зондировании прибора, флуоресценции *in vivo*, которую измеряли в кювете (объемом 1,25 л) на палубе судна в пробах морской воды, взятой с горизонтов в зонах малого градиента концентрации хлорофилла. Так как оба значения флуоресценции совпали, корреляционная зависимость оценивалась между флуоресценцией и концентрацией хлорофилла в кювете, полагая, что идентичная зависимость существует и в море.

Как и в случае опытов с водорослями, *in situ* прямолинейная зависимость между флуоресценцией и хлорофиллом наблюдалась до концентрации пигмента приблизительно $1,0-1,5 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$. В

связи с тем, что массив данных флуориметрического зондирования на полигоне в северо-западной и прилегающей глубоководной частях Черного моря, главным образом, охватывал удельную флуоресценцию, соответствующую концентрации пигмента ниже $1,5 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$, основное внимание в работе будет уделено этим результатам.

В данном районе моря наблюдали три типа профилей распределения УФХ по глубине у которых: 1) на поверхности или в верхнем квазиоднородном слое УФХ была несколько выше, чем в основании зоны фотосинтеза, 2) было отмечено некоторое увеличение УФХ на глубине и 3) практически отсутствовали различия в УФХ по глубине. Выделение определенных участков моря по типу профиля не привело к положительному результату. Напротив, оценка средней УФХ для всего исследованного района по слоям: 0-10 м, слой термоклина и слой ниже термоклина, не показала различия по слоям. Поэтому, мы считали возможным в дальнейшем рассматривать слой фотосинтеза в целом, без деления на горизонты.

Сопоставление средней по слою фотосинтеза УФХ для станций всего исследованного района моря выявило вариабельность этих величин, однако, в значительно меньшей степени, чем мы наблюдали для отдельных водорослей (табл.2).

Таблица 2

Удельная флуоресценция хлорофилла средняя для слоя фотосинтеза на отдельных станциях в северо-западной и прилегающей глубоководной частях Черного моря

№	Координаты	Глубина на	Время зон	УФХ
	φ (с.ш.)	λ (в.д.)	станции, м	дирования отн.ед.

Продолжение таблицы 2

1.	44°50/	32°45/	130	22 ⁰⁰	0,92
2.	- // -	31°15/	80	12 ⁰⁰	0,75
3.	- // -	30°45/	66	15 ⁰⁰	0,82
4.	- // -	30°15/	50	19 ⁰⁰	0,56
5.	44°30/	29°15/	40	24 ⁰⁰	0,99
6.	- // -	30°45/	90	9 ⁰⁰	0,78
7.	- // -	31°00/	125	17 ⁰⁰	0,99
8.	- // -	31°15/	515	20 ⁰⁰	1,17
9.	- // -	32°15/	1300	3 ⁰⁰	1,40
10.	44°10/	32°45/	210	21 ⁰⁰	1,15
11.	- // -	30°45/	1000	5 ⁰⁰	1,14
12.	- // -	29°15/	60	5 ⁰⁰	0,88
13.	43°50/	29°45/	156	17 ⁰⁰	0,76
14.	- // -	30°45/	1010	23 ⁰⁰	1,29
15.	- // -	31°45/	1700	7 ⁰⁰	0,92
16.	- // -	32°15/	1800	11 ⁰⁰	1,26
17.	- // -	32°45/	1950	15 ⁰⁰	1,15
18.	- // -	32°15/	1990	23 ⁰⁰	0,98
19.	- // -	33°45/	2070	3 ⁰⁰	1,12
20.	- // -	34°15/	2085	8 ⁰⁰	1,20

По результатам натурных измерений было рассчитано уравнение регрессии для прямолинейного участка зависимости флуоресценции от концентрации хлорофилла (уравнение 1, табл.3). Поскольку, условия по гидрологии, гидрохимии, гидрооптики, таксономическому составу и физиологическому состоянию фитопланктона, т.е. факторы вероятнее всего ответственные за ва-

риабельность флуоресценции *in situ* в прибрежье и открытом море отличаются, нами были рассчитаны уравнения линейной регрессии отдельно для этих участков Черного моря (уравнения 2 и 3, соответственно, табл.3).

Таблица 3

Уравнения линейной регрессии зависимости флуоресценции ($\Phi_{in situ}$) от концентрации хлорофилла ($C_{хл.}$) в северо-западной и прилегающей глубоководной частях Черного моря.

№	Вид уравнения	Количество из- мерений	Коэффи- циент корреля- ции	Средняя квадратич- ная ошиб- ка для $P = 0,95$
1.	$\Phi_{in situ} = 1,01 C_{хл.}$	107	0,78	11%
2.	$\Phi_{in situ} = 0,88 C_{хл.}$	31	0,73	26%
3.	$\Phi_{in situ} = 1,13 C_{хл.}$	76	0,94	11%
4.	$\Phi_{in situ} = 0,17 C_{хл.} + 0,63$	20	0,75	36%

Статистическое сравнение линий регрессии, описываемых уравнениями 2 и 3, показало, что различия между угловыми коэффициентами в уравнениях значимо, а коэффициенты корреляции не различаются. Следовательно, весь исследованный район Черного моря характеризовался одинаково высокой корреляционной связью между флуоресценцией *in situ* и концентрацией хлорофилла в морской воде. В тоже время, различия в факторах, ответственных за вариабельность флуоресценции в море, привели к разным уравнениям регрессии и величинам коэффициентов вари-

ации для открытого моря и побережья. Также следует отметить, что расчет интенсивности флуоресценции на единицу хлорофилла и единицу суммарной концентрации хлорофилла и феофитина не привел к заметному различию в коэффициентах вариации для обоих случаев.

Для концентрации хлорофилла больше $1,5 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$ и соответствующих им величинам флуоресценции было рассчитано уравнение линейной регрессии отдельно (уравнение 4, табл.3). В это уравнение вошли данные, полученные в основном на мелководных станциях. Ошибка измерения концентрации по флуоресценции здесь была самой большой из рассмотренных случаев - 36%.

Обсуждение результатов

Известно, что в простой фотохимической системе энергия возбуждения молекул хлорофилла тратится на фотохимические реакции, флуоресценцию и тепловые превращения и что флуоресценция и фотохимия являются комплементарными членами в уравнении [10]:

$$\Phi_c + [(K_f / K_r) + 1] \Phi_f = I, \text{ где}$$

Φ_c и Φ_f - квантовые выходы химических и флуориметрических превращений, соответственно,

K_f и K_r - константы скоростей флуоресценции и тепловых превращений, соответственно.

Следовательно, выход флуоресценции *in vivo* или *in situ* зависит от факторов, влияющих на скорость фотосинтеза в море. Многообразие этих факторов и сложность учета их влияния на природные фотосистемы и ограничивает применение флуориметрических методов для определения концентрации хлорофилла в натурных исследованиях.

Одним из основных факторов, ответственным за вариабельность удельной флуоресценции в море, может быть изменение в таксономическом составе фитопланктона [5,10,11]. Наши опыты *in vivo* показали, что экстремальные величины удельной флуоресценции в среднем различаются в 4 раза практически у всех исследованных водорослей (табл. I). Такие же различия в экстремальных значениях удельной флуоресценции (в 4-5 раз) были получены Стрикландом [11] на *Thalassiosira rotula*, *Skeletonema costatum*, *Amphidinium carteri*, *Nitzschia seriata*, *Syracosphaera carterae*, *Dunaliella tertiolecta*, *Coscinodiscus wailesii*; Словачеком и Ханном [10] на *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros galvestonensis*, *Cyclotella* sp. и Флемером [5], проводившем измерения концентрации хлорофилла и флуоресценции в море до и во время цветения динофлагеллят *Prorocentrum* и *Peridinium*.

Сравнивая результаты измерений флуоресценции у различных водорослей и имеющиеся в литературе данные о влиянии внешних факторов (освещенности, биогенных и других химических элементов) на удельную флуоресценцию [7,8,10] можно полагать, что изменения в таксономическом составе фитопланктона играют более существенную роль в вариабельности флуоресценции в море, чем внешние факторы.

Получив большие различия в удельной флуоресценции у водорослей, которые доминировали в исследованном районе моря, мы ожидали получить такие же различия в удельной флуоресценции и в натурных исследованиях, особенно в прибрежной части моря, где пространственно-временные колебания видового состава фитопланктона наибольшие [6]. Однако, колебания значений флуо-

ресценции на единицу хлорофилла как по вертикали, так и горизонтали на полигоне в северо-западной и прилегающей глубоководной частях Черного моря были значительно меньше, чем в опытах *in vivo* (табл.2) .

Несоответствие результатов, полученных нами в лаборатории и в море можно объяснить следующим образом. Как уже отмечалось, на выход флуоресценции в море влияет целый ряд факторов, а именно: изменение в таксономическом составе и физиологическом состоянии фитопланктона, биогенные и другие химические соединения, освещенность. Действие каждого отдельного фактора оценивалось, как правило, в лаборатории, на культурах определенных видов водорослей. Напротив, в море мы наблюдаем совокупный результат действия всевозможных, случайно направленных факторов, как внутренних, так и внешних, на неоднородный по таксономическому составу фитопланктон и в результате получили удельную флуоресценцию приблизительно равную среднему значению для всех исследованных в опытах *in vivo* планктонных водорослей, но со значительно меньшим разбросом.

В ы в о д ы

1. Величина максимальной удельной флуоресценции хлорофилла отличается от минимальной у отдельных планктонных водорослей в 4 и более раз.
2. Для северо-западной и прилегающей глубоководной частей Черного моря рассчитаны уравнения линейной регрессии для всего района исследования и отдельно глубоководного и мелководного участков моря. Эти уравнения дают возможность воспроизводить профили концентрации хлорофилла по данным флуориметрического зондирования.

Л е т е р а т у р а

1. Владимиров В.Л., Мартынов О.В. Прибор для измерения флуоресценции хлорофилла в поверхностном слое океана.- В кн.: Методы и аппаратура для океанологических исследований. Севастополь, 1982, с.65-69.
2. Современные методы количественной оценки распределения морского планктона/ Под ред. Виноградова М.Е. М.: Наука, 1983, с.279.
3. Экологическая физиология морских планктонных водорослей в условиях культур/ Под ред. Хайлова К.М. Киев: Наукова Думка, 1971, с.207.
4. Юнев О.А., Берсенева Г.П. Флуориметрический метод определения концентрации хлорофилла "а" и феофитина "а" в фитопланктоне.- Гидробиол.журнал, 1986, 22, №2, с.102-108.
5. Flemer D.A. Continuous measurement of in vivo chlorophyll of a dinoflagellate bloom in Chesapeake Bay.- Chesapeake Sci., 1969, 10, 12, p.99-103.
6. Hulburt E.M. The diversity of phytoplanktonic populations in oceanic, coastal and estuarine regions.- J.Mar.Res., 1963, 21, p.81-93.
7. Kiefer D.A. Fluorescence properties of natural phytoplankton populations.- Marine Biol., 1973, 22, 3, p.263-269.
8. Kiefer D.A. Chlorophyll a fluorescence in marine centric diatoms: responses of chloroplasts to light and nutrient stress.- Marine Biol., 1973, 23, 1, p.39-46.
9. Loftus M.E., Seliger H.H. Some limitations of the in vivo fluorescence technique.- Chesapeake Sci., 1975, 2, 2, p.79-92.

10. Slovacek R.E., Hannan P.J. "in vivo" fluorescence determination of phytoplankton chlorophyll "a".- Limnol. and Oceanogr., 1977, 22, 5, p.919-925.
11. Strickland J.D.H. Continuous measurement of in vivo chlorophyll; a precautionary note.- Deep-Sea Res., 1968, 15, p.225-227.
12. Weber E. Grundriss der biologischen Statistik.- 7 Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1972.

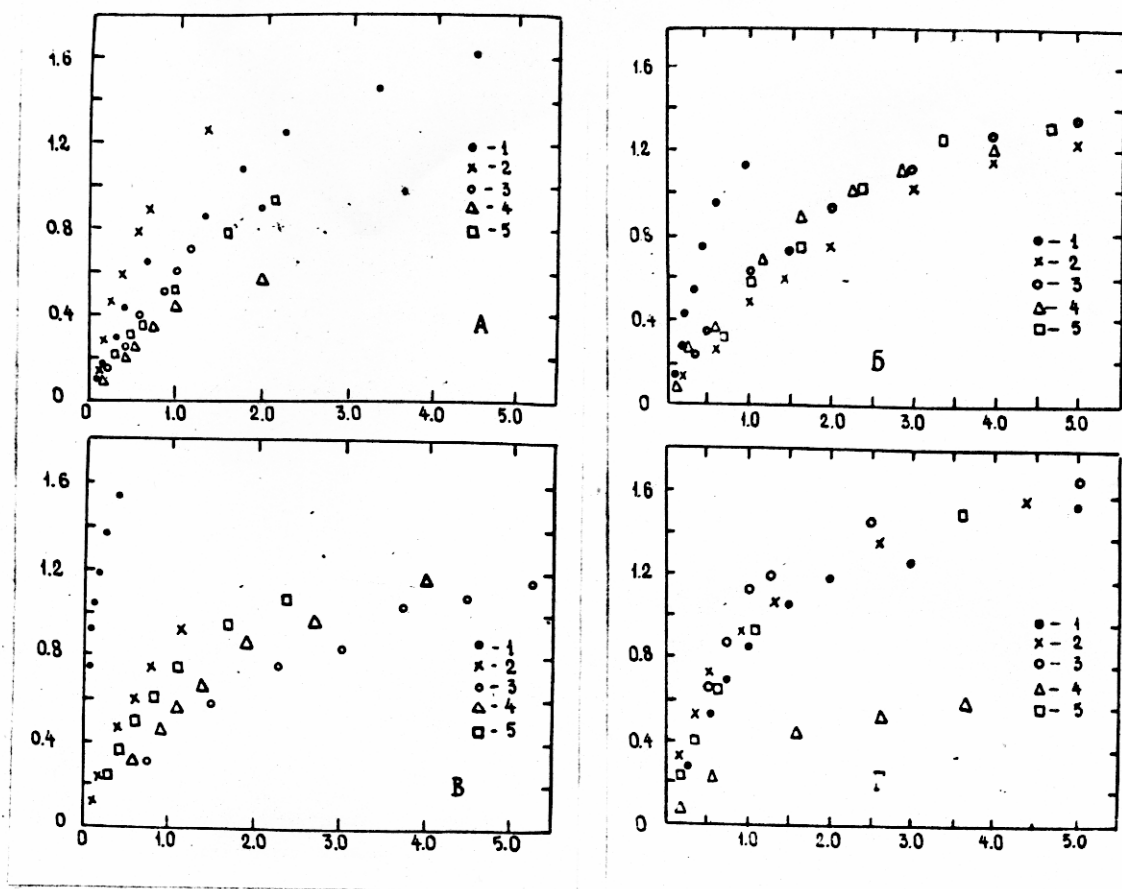


Рис.1. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации хлорофилла у планктонных водорослей.

По вертикали - интенсивность флуоресценции, вольты;
по горизонтали - концентрация хлорофилла, мкг $\times$ л⁻¹.

А - пиррофитовые: 1- *Euxyiaella cordata*, 2- *Gymnodinium kovallevski*, 3- *Gyrodinium fissum*, 4- *Prorocentrum micans*, 5- *Gymnodinium splendens*.

Б - диатомовые: 1- *Phaeodactylum tricornutum*, 2- *Skeletonema costatum*, 3- *Leptocylindrus minimus*, 4- *Chaetoceros insignis*, 5- *Thalassiosira parva*.

В - золотистые и зеленые: 1- *Monohrasis luteri*, 2- *Pontohaea huxleyi*, 3- *Olishadiscus luteri*, 4- *Dunaliella salina*, 5- *Platymonas viridis*.

Г - мелкие жгутиковые: 1- Черное море, Севастопольская бухта; 2- 10 миль от Севастополя, 1980 г.; 3- 10 миль, 1981 г.; 4- Индийский океан №1; 5- Индийский океан №2.

- 17 -

Печатается в соответствии с решением
Редакционно-издательского Совета Ин-
ститута биологии южных морей АН УССР
от " 4 " апреля 1986 г.

ать от 13.5.86.

Цена 1-70

Зак. 32792

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ
Люберцы, Октябрьский пр., 403