

Флуоресцентный метод изучения распределения хлорофилла и процессов первичной продукции в водной среде



С.А. Мошаров
Институт океанологии
им. П.П. Ширшова
РАН

Хлорофилл- фотосинтез – первичная продукция

Хлорофилл – основной пигмент в растительных клетках, связанный с фотосинтезом

Фотосинтез – это биологическая конверсия световой энергии в химически связанную энергию, которая запасается в форме углеродных органических соединений.



Фотосинтез – первичный источник органического вещества для роста и развития всех организмов в экосистеме (первичная продукция).

Первичная продуктивность зависит от уровня освещенности, скорости фотосинтеза и количества хлорофилла

Фотосинтез – световая и темновая фазы

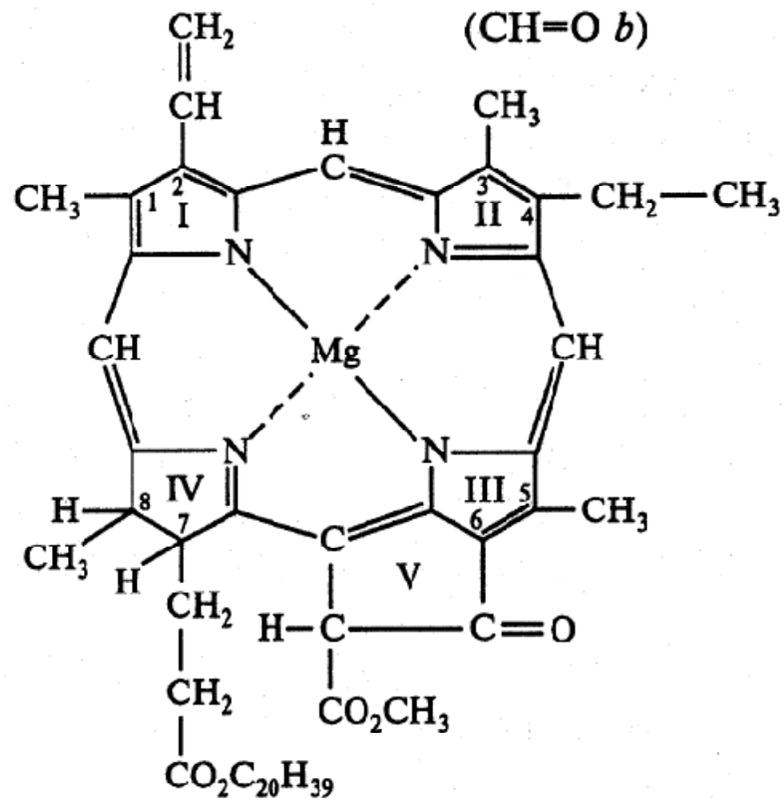
А) **световая фаза** (первичные процессы фотосинтеза) – за счет энергии света синтезируются АТФ и НАДФН с высоким восстановительным потенциалом

Квант света \rightarrow Хл* \rightarrow НАДФН и АТФ

Б) **темновая фаза** – за счет энергии АТФ и НАДФН в цикле Кальвина происходит фиксация CO_2 (т.е. последовательное включение CO_2 в органические соединения)

НАДФН и АТФ \rightarrow цикл Кальвина (фиксация CO_2) \rightarrow новое ОВ

Структура хлорофилла



Хлорофилл *a*

Z-схема электрон-транспортной цепи

(Гавриленко, Жигалова, 2003)

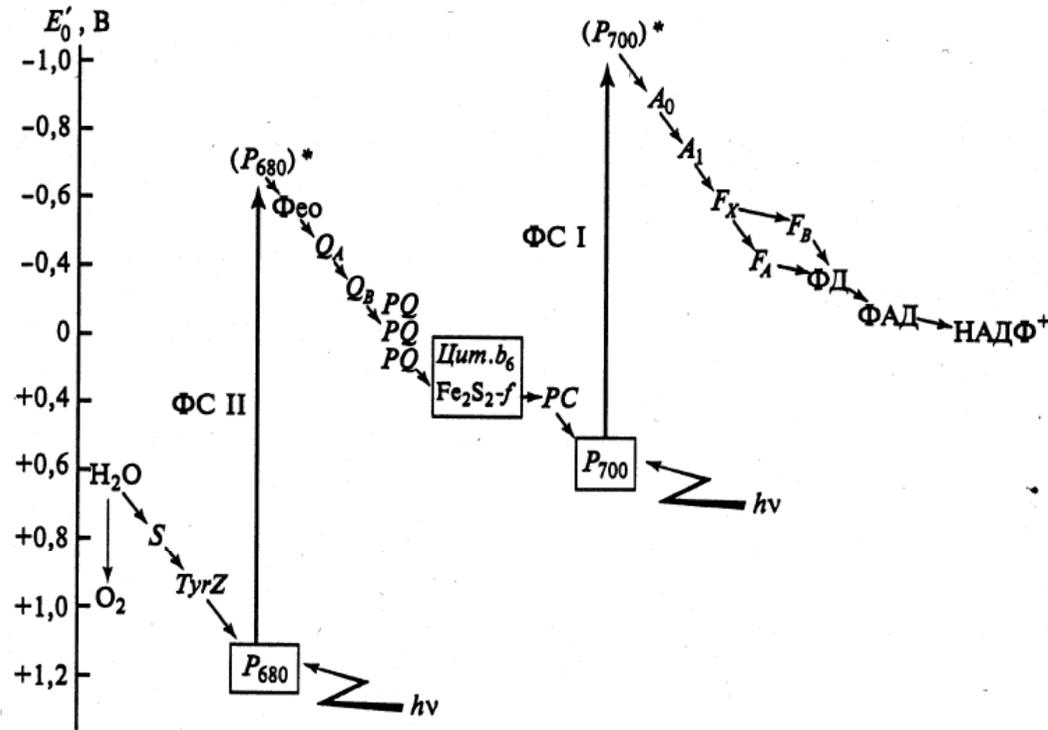


Рис. 54. Z-схема электрон-транспортной цепи хлоропластов:

S — водоокисляющий комплекс; *TyrZ* — донор реакционного центра ФС II (тирозин 161); *Фео* — феофитин; *Q_A*, *Q_B* — пластохиноны — вторичные акцепторы электронов ФС II; *PQ* — пул пластохинонов; *Цит. b₆* — цитохром *b₆*, *Fe₂S₂* — центр Риска; *f* — цитохром *f*, *PC* — пластоцианин; *A₀* — хлорофилл *a* — первичный акцептор электронов реакционного центра ФС I; *A₁* — витамин *K₁*; *F_x*, *F_A*, *F_B* — железосерные белки акцепторного комплекса ФС I; *ФД* — ферредоксин; *ФАД* — ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза

Структурная схема электрон-транспортной цепи (Гавриленко, Жигалова, 2003)

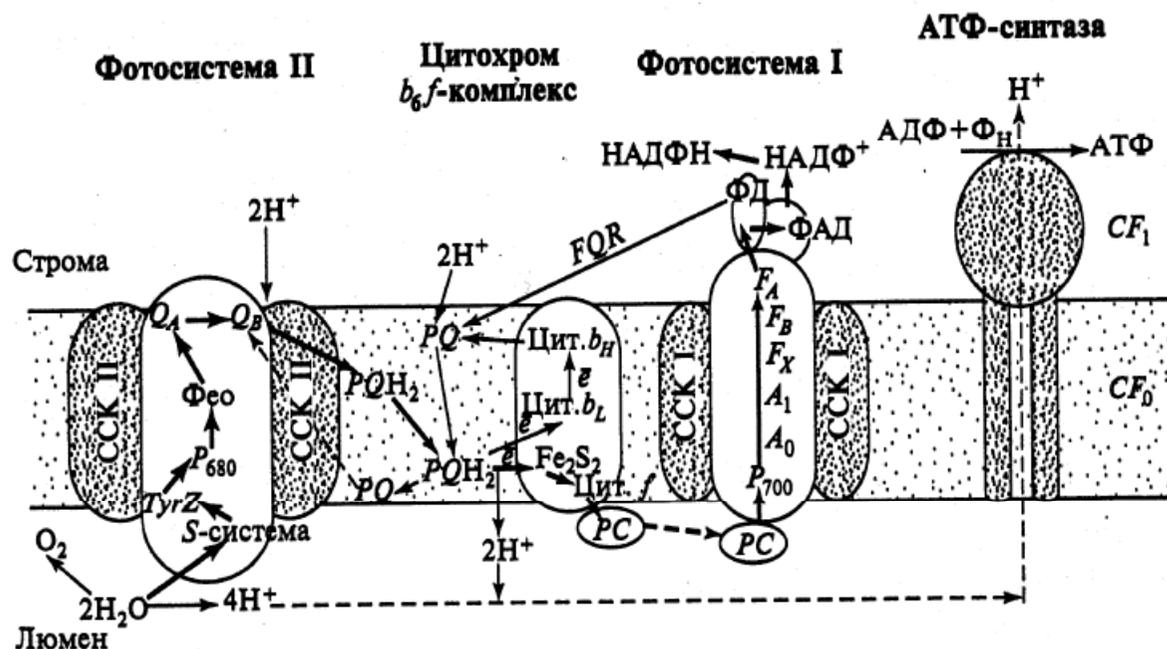


Рис. 55. Схема организации электрон-транспортной цепи в мембране тилакоидов:

ССК I — светособирающий комплекс I; ССК II — светособирающий комплекс II; CF_0 — сопрягающий фактор 0; CF_1 — сопрягающий фактор 1; Цит. b_H — цитохром b_6 высокопотенциальный; Цит. b_L — цитохром b_6 низкопотенциальный; FQR — ферредоксинхиноноксидоредуктаза. Остальные обозначения, как на рис. 54

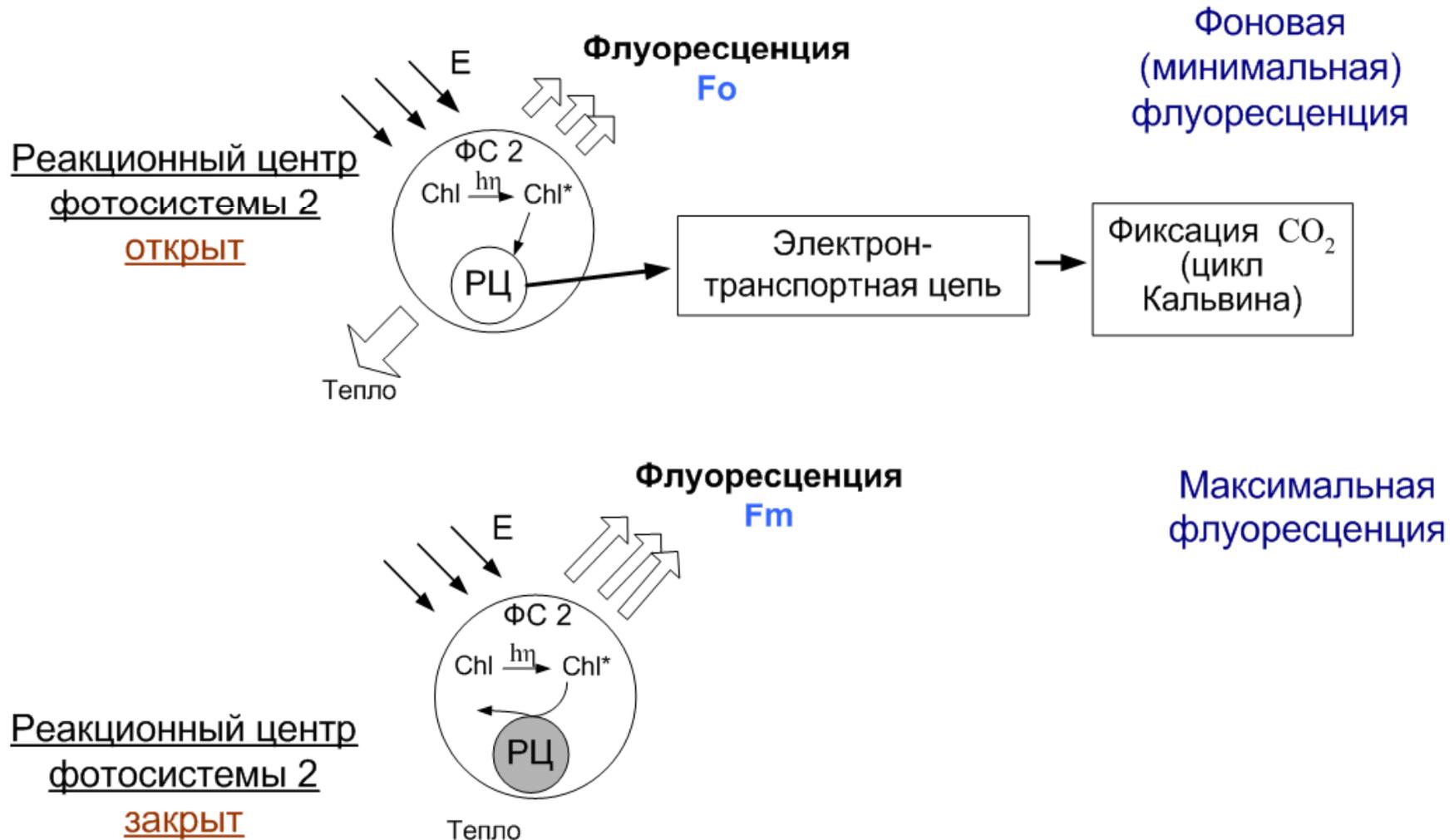
Хлорофилл – основной источник флуоресценции в фотосинтезирующих организмах

Флуоресценция – испускание квантов красного света возбужденной молекулой хлорофилла.

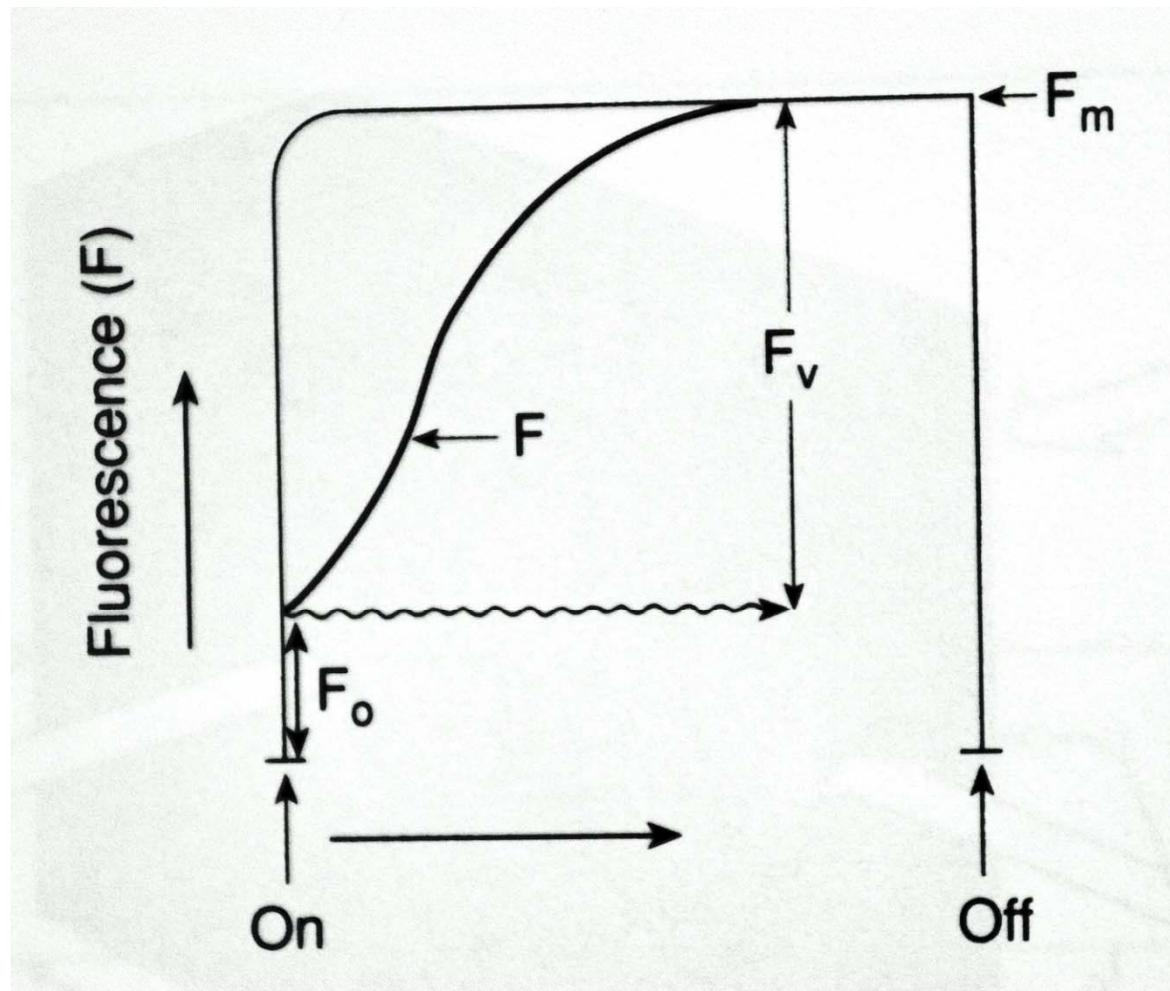
Поглощенная энергия света трансформируется хлорофиллом в трех направлениях:

- Используется в первичных процессах фотосинтеза;
- Рассеивается в виде тепла;
- Излучается в виде флуоресценции.

Флуоресценция хлорофилла (схема)



Флуоресценция хлорофилла - кинетика



Флуоресценция хлорофилла (измеряемые параметры)

F_o – минимальная (постоянная, фоновая) флуоресценция (в темноте).

F_m – максимальная флуоресценция (при достаточно сильном освещении).

F_t – флуоресценция хлорофилла клеток, адаптированных к определенному уровню света.

F'_m – максимальная флуоресценция хлорофилла клеток, адаптированных к определенному уровню света.

Флуоресценция хлорофилла (расчетные параметры)

$F_v/F_m = (F_o - F_m)/F_m$ - относительная переменная флуоресценция, максимальный квантовый выход в ФС2 (пропорциональна доле открытых РЦ и, соответственно, коррелирует с фотосинтетической активностью) (от 0 до 0.8)

$Y = (F'm - F_t)/F'm$ - эффективный квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС2

$rETR = ((F'm - F_t)/F'm) \times E \times 0.5$ – относительная скорость электронного транспорта

$qP = (F'm - F_t)/(F'm - F'o)$ - фотохимическое тушение на действующем свете (отражает степень окисленности акцептора Q_a (от 0 до 1), т.е. светоиндуцированную активацию ЭТЦ)

$NPQ = ((F_m/F'm) - 1)$ - нефотохимическое тушение на действующем свете (отражает (варьирует от 0 до 10))

Разные типы флуориметров

1. Лабораторный флуориметр
2. Проточный флуориметр
3. Погружной флуориметр
4. Датчик флуориметрии
5. Микрофлуориметр

Влияние света на флуоресценцию

Маторин и др., 2006

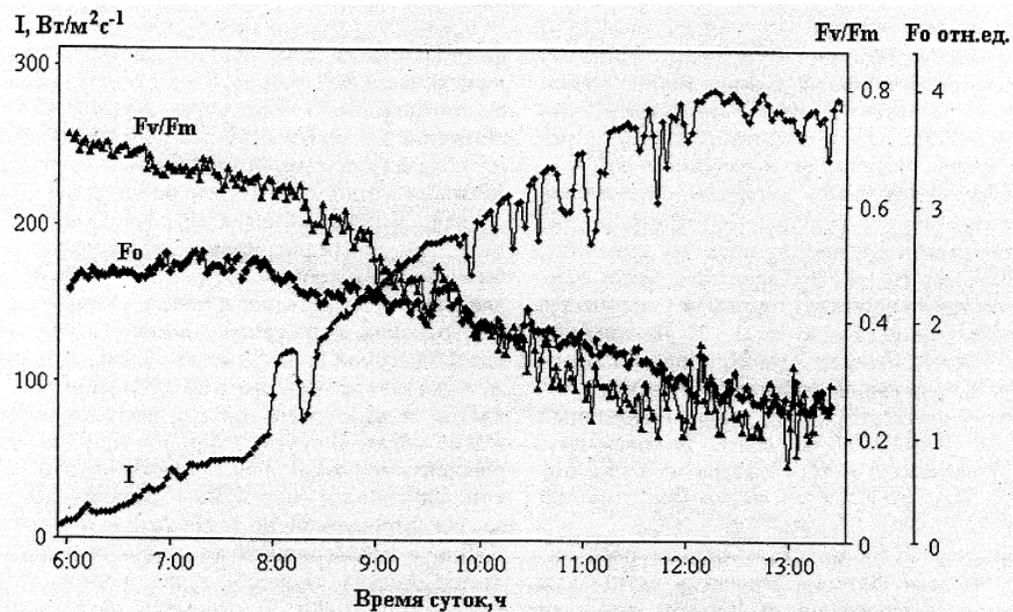
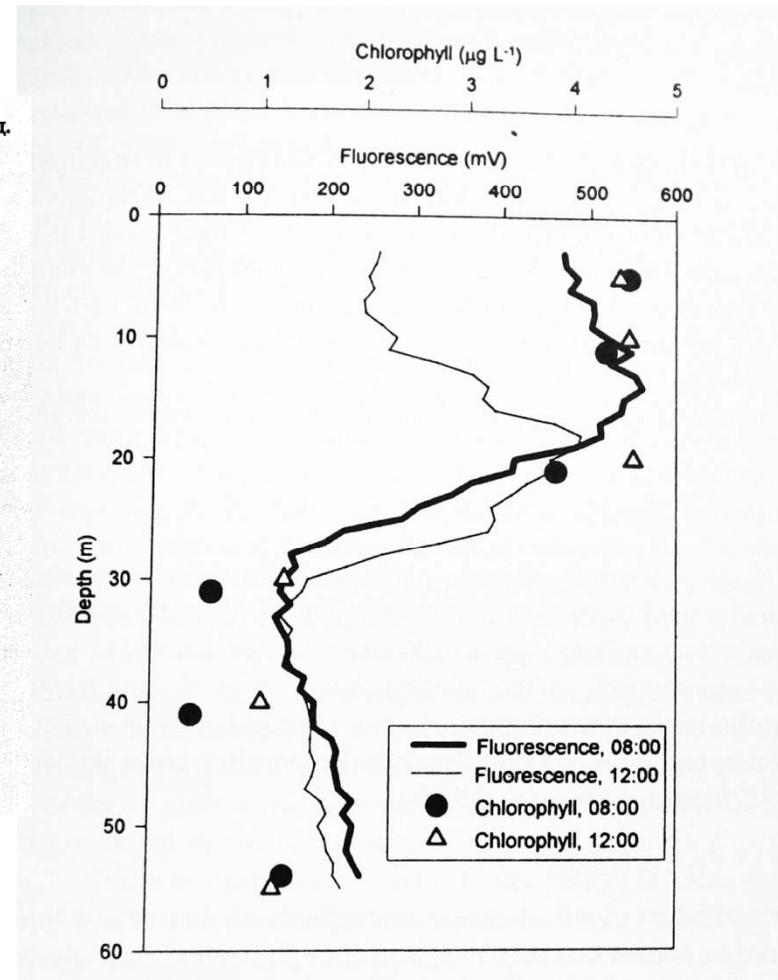


Рис. 3. Кривые изменения освещенности I (Вт/м^2) и параметров флуоресценции F_o (отн.ед.) и F_v/F_m микроводорослей в дневные часы на ст. Р1 в Балтийском море.

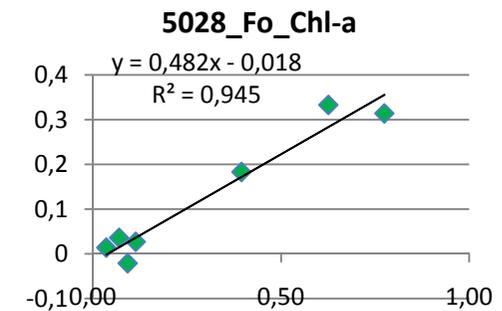
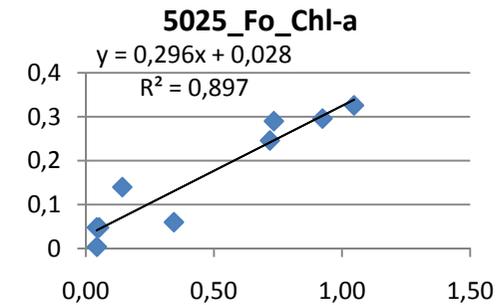
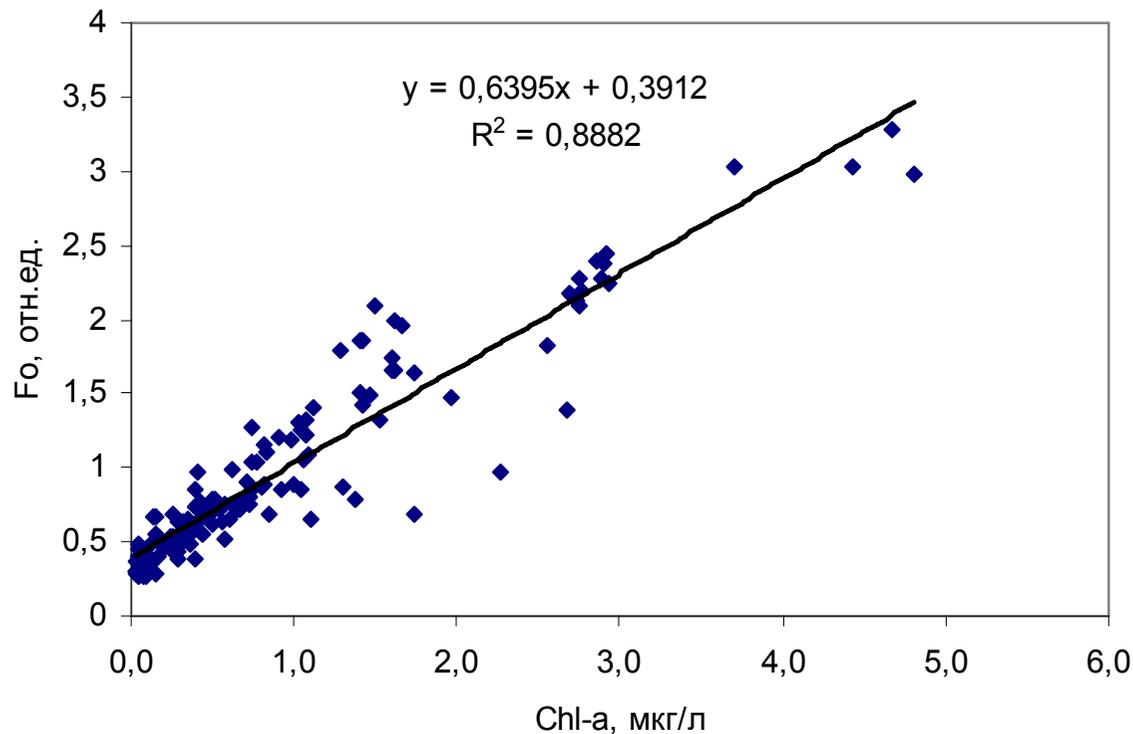
Измерения сделаны проточным флуорометром

(Falkowski, Raven, 2007)



Зависимость флуоресценции хлорофилла "а" от его концентрации в воде

Карское море, 2011 г. (Мошаров)



170 пар значений (концентрация хлорофилла «а», флуоресценция Fo)
Коэффициент корреляции 0,94

Различные соотношения Fo/Chl для разных видов водорослей (Маторин и др., 2010)

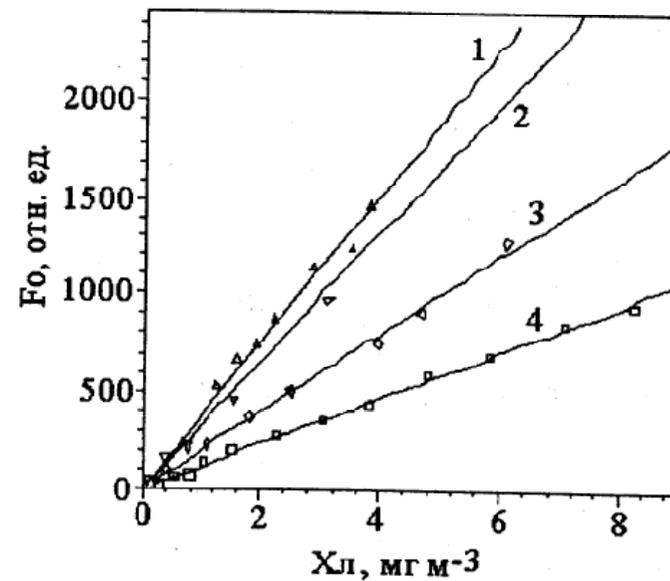


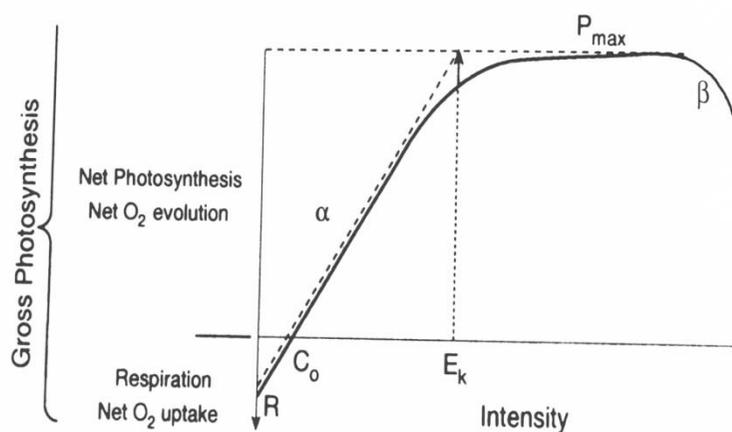
Рис. 31. Зависимость интенсивности Fo от концентрации хлорофилла для четырех видов морских водорослей, относящихся к трем различным таксонам: диатомовая водоросль- *Th. weissflogii* (1), желтозеленая – *N. salina* (2) и зеленые - *Ankistrodesmus* sp., и *P. viridis* (3 и 4 соответственно).

Применение флуоресцентных параметров для оценок активности ФПл

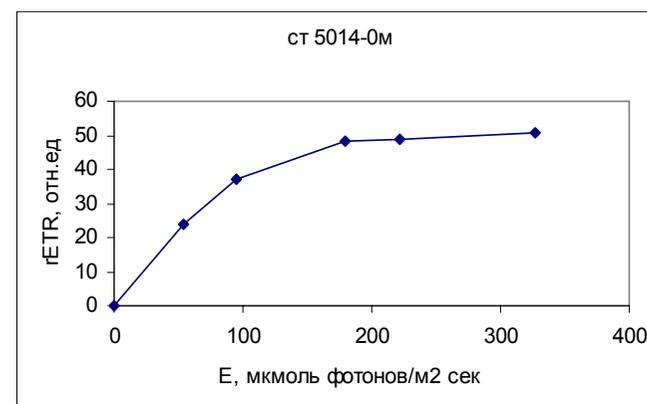
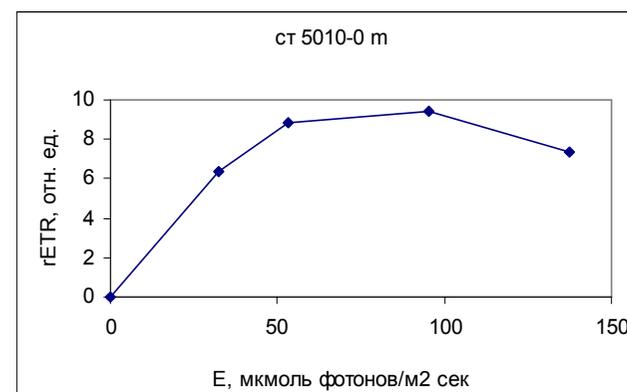
1. Оценка обилия фитопланктона по F_o
2. Оценка потенциальной фотосинтетической активности фитопланктона по F_v/F_m
3. Оценка реальной фотосинтетической активности при определенном уровне освещенности по Y
4. Определение параметров «Световой кривой фотосинтеза» и уровня адаптации фитопланктона к освещенности (E_k , $\max rETR$)
5. Контроль за развитием фитопланктона в экспериментах (F_o , F_m , F_v/F_m)
6. Исследование быстрых процессов снижения и восстановления фотосинтетической активности (например, фотоингибирование и фотоповреждение) (F_o , F_m , F_v/F_m , NPQ)

Световые кривые фотосинтеза (зависимость скорости фотосинтеза от освещенности)

Оценка фотосинтеза по выделению
кислорода
(Falkovski, Raven, 2007)

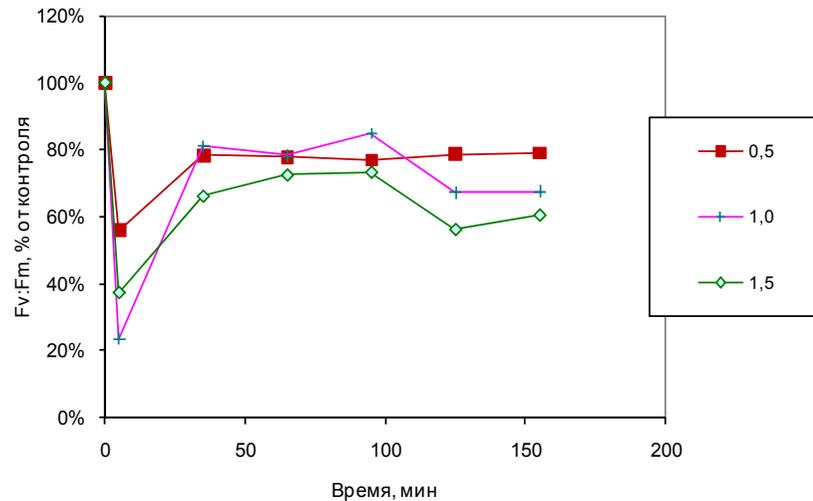


Оценка фотосинтеза по
флуоресцентным показателям,
Карское море, 2011 г. (Мошаров)

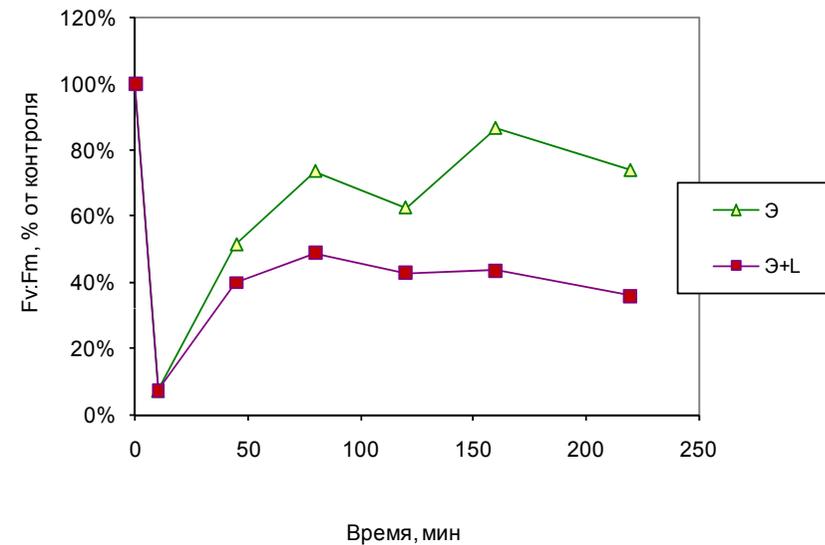


Изучение процессов фотоингибирования и фотоповреждения

Тропическая Атлантика, 2012 (Мошаров, Ступникова)



Восстановление Fv/Fm после засветки разной длительности



Восстановление Fv/Fm при ингибировании новосинтеза хлоропластного белка D1

Модель для расчета скорости фотосинтеза фитопланктона по флуоресцентным параметрам (на примере Балтийского моря)

(Антал и др., 2001)

$$P(z) = 6.9 \sum_{i=1}^n (k_m F_o(z) F_v / F_m(z)) \frac{I_{1/2m}}{I(z) + I_{1/2m}} I(z) \Delta t$$

Входные параметры:

$k_m = a_{PSP} / F_o$ (где a_{PSP} - светопоглощательная способность пигментов)

F_o и F_v / F_m - постоянная и относительная переменная флуоресценция хлорофилла

$I_{1/2m}$ - интенсивность света, полунасыщающая скорость фотосинтеза

Связь рассчитанной ПП по флуоресценции с измеренной ПП по радиоуглеродному методу

(Антал и др., 2001)

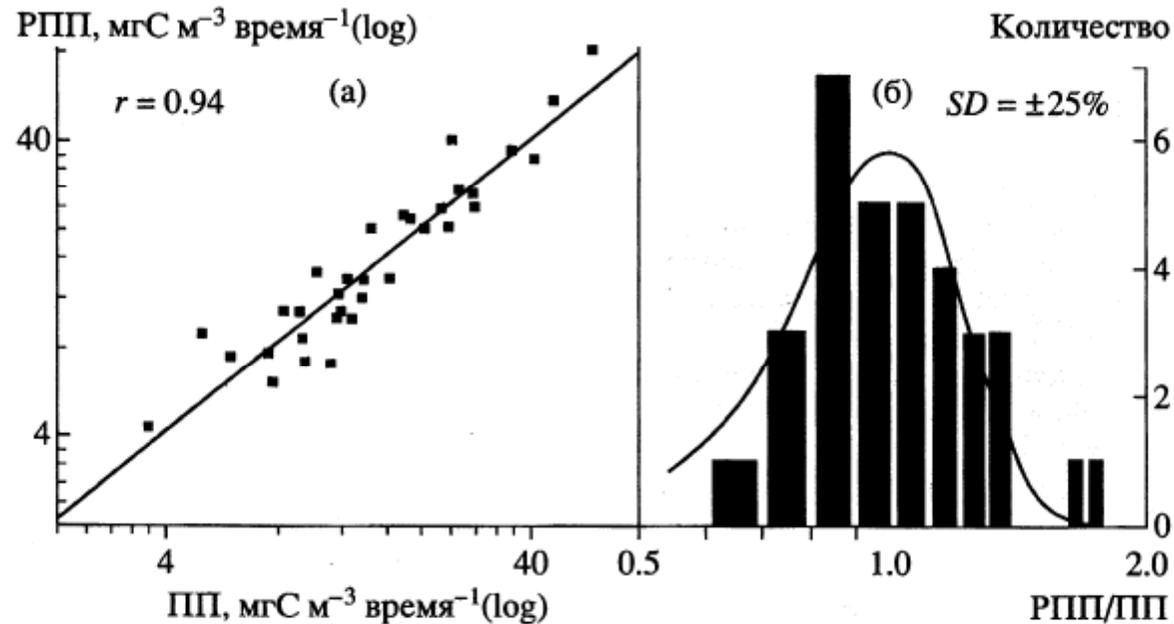


Рис. 6. Зависимость рассчитанной по (8) средней в столбе воды первичной продукции фитопланктона от измеренной радиоуглеродным методом на станциях Балтийского моря (а) и гистограмма распределения отношений РПП/ПП (б).