

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

---

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

УДК 535.373.2

ГОРБУНОВ Максим Юрьевич

ДИАГНОСТИКА ФИТОПЛАНКТОНА МЕТОДАМИ  
НАНОСЕКУНДНОЙ ИМПУЛЬСНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОРИМЕТРИИ

01.04.21 - лазерная физика

**А в т о р е ф е р а т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва - 1992

к

Работа выполнена на кафедре квантовой радиофизики физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,  
профессор В.В.ФАДЕЕВ;

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
А.Ю.БОРИСОВ;  
кандидат физико-математических наук,  
А.Л.СУРОВЕГИН.

Ведущая организация: Институт общей физики РАН.

Защита состоится " 11 " июня 1992 г. в 15<sup>00</sup> часов  
в конференц-зале корпуса нелинейной оптики на заседании  
специализированного Ученого Совета № I отделения радиофизики  
в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова,  
шифр К 053.05.21.

Адрес: И198  
факультет, учено  
№ I отделения ра

С диссертаци  
факультета МГУ.

Авторефера

Ученый  
специализиро  
отделения  
кандидат физикс

физический  
Совета

ического

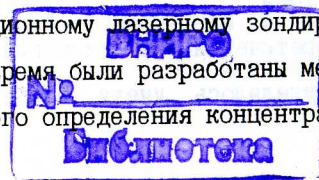
омонова

### Актуальность темы диссертации

Благодаря уникальной способности к фотосинтезу фитопланктон (ФП) играет ключевую роль в функционировании экосистем морей, океанов и внутренних водоемов, являясь первичным звеном трофической цепи, обеспечивая регуляцию содержания углекислого газа и кислорода в воде и атмосфере. На его долю приходится около 70% всей утилизации углекислого газа фотосинтезирующими организмами на Земле. ФП является также чутким индикатором антропогенных и природных загрязнений Мирового океана. В связи с остротой, которую в последнее время приобрели проблемы контроля этих процессов, возникает потребность в разработке современных экспрессных дистанционных методов диагностики ФП, которые обладали бы адекватными возникающим задачам возможностями.

Дистанционные лазерные методы диагностики ФП основаны на возбуждении приповерхностного слоя воды лазерными импульсами, регистрации и спектральном анализе возникающего эхо-сигнала. Вкладом ФП в эхо-сигнал является полоса флуоресценции хлорофилла "а", которая формируется на стадии первичных процессов фотосинтеза, индуцируемых лазерным излучением, и несет информацию о состоянии фотосинтетического аппарата. Квантовый выход флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo* сильно зависит от эффективности фотосинтеза, стадии роста клеток ФП, освещенности, условий минерального питания и других внешних факторов. Это, с одной стороны, усложняет задачу количественного определения ФП на основе измерения характеристик флуоресценции, но в то же время, открывает возможности диагностики функционального состояния ФП.

Работы по дистанционному лазерному зондированию ФП ведутся более 15 лет. За это время были разработаны методы и аппаратура дистанционного лазерного определения концентрации фитопланктона,





которые прошли натурные испытания и использовались для решения задач экологического мониторинга в различных частях Мирового океана. Однако, до настоящего времени возможности дистанционного зондирования (как активного, в том числе лазерного, так и пассивного) были ограничены отсутствием методов определения эффективности фотосинтеза. Кроме того, все более актуальной становится проблема разработки экспрессных лазерных методов функциональной диагностики фотосинтезирующих организмов, которые позволяли бы не только определять их фотосинтетическую активность, но и выяснять причины тех или иных ее изменений.

Успешное решение этих проблем было бы невозможно без развития теоретической модели, позволяющей адекватно описать процессы формирования флуоресцентного отклика ФП на импульсное лазерное возбуждение; экспериментальных лабораторных исследований с целью совершенствования существующих и развития новых методов лазерной диагностики ФП; проведения натурных измерений с целью проверки разработанных методов и получения новых результатов.

#### Цель работы

Целью диссертационной работы являлось:

- теоретическое и экспериментальное исследование механизмов формирования флуоресцентного отклика фитопланктона на импульсное лазерное возбуждение;
- разработка на этой базе новых методов лазерной диагностики фитопланктона, в том числе в дистанционном варианте;
- применение разработанных методов в лабораторных и натурных исследованиях фитопланктона.

При проведении теоретических и экспериментальных исследований особое внимание уделялось учету влияния функционального

состояния фотосинтетического аппарата на характеристики флуоресценции хлорофилла "а". Одной из задач работы была разработка дистанционного метода определения фотосинтетической активности, открывающего принципиально новые возможности в натурных исследованиях. В лабораторных экспериментах основной акцент был сделан на развитие метода лазерной флуориметрии насыщения, позволяющего решать как фундаментальные задачи исследования процессов фотосинтеза, так и проблемы функциональной диагностики фитопланктона.

#### Научная новизна

В диссертационной работе получены следующие основные результаты, выносимые на защиту:

1. Разработана и экспериментально обоснована основанная на мультицентральной структуре фотосинтетического аппарата модель, описывающая процессы формирования флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo* при импульсном лазерном возбуждении.
2. Разработан и применен в лабораторных и натурных исследованиях дистанционный лазерный метод определения относительного выхода переменной флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo*.
3. Создан автоматизированный двухимпульсный лидар для дистанционных измерений фотосинтетической активности и концентрации хлорофилла "а" фитопланктона.
4. Исследованы в натурных условиях механизмы регуляции фотосинтетической активности фитопланктона *in situ* и квантового выхода флуоресценции хлорофилла "а" при изменениях естественной освещенности. Показано, что для приповерхностного фитопланктона основными механизмами световой регуляции являются фотоингибирование первичных стадий фотосинтеза и энергизационное тушение флуоресценции.



5. Разработан метод разделения вкладов рекомбинационного и нерекомбинационного компонентов в изменениях флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo*, основанный на анализе кривых насыщения флуоресценции. Применение этого метода позволило установить, что увеличение квантового выхода флуоресценции хлорофилла "а" фитопланктона при недостатке минерального питания обусловлено увеличением как рекомбинационного, так и нерекомбинационного компонентов.

6. Показано, что разработанные методы импульсной лазерной флуориметрии позволяют селективно идентифицировать внешние факторы, неблагоприятно воздействующие на фотосинтетический аппарат.

#### Практическая ценность

Разработанная в диссертации модель, основанная на мультицентральной структуре фотосинтетического аппарата, может быть применена для адекватного описания процессов миграции энергии в первичных реакциях фотосинтеза при наносекундном импульсном фотовозбуждении.

Разработанная лазерная методика дистанционного измерения относительного выхода переменной флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo* позволяет проводить исследования первичных фотосинтетических процессов *in situ* - непосредственно в среде обитания фитопланктона, а также дистанционно определять его фотосинтетическую активность, что открывает принципиально новые возможности в натурных исследованиях. В частности, на этой базе могут быть созданы новые дистанционные методы оценки первичной продукции и дистанционного лазерного биомониторинга водных сред.

Созданный двухимпульсный автоматизированный лидар применя-

ется для дистанционного мониторинга концентрации хлорофилла "а" и фотосинтетической активности фитопланктона на протяженных акваториях.

Разработанные в диссертационной работе методы наносекундной импульсной лазерной флуориметрии могут применяться для экспрессной диагностики функционального состояния фитопланктона, а также других классов фотосинтезирующих организмов, в том числе высших растений.

#### Апробация работы

Основные результаты работы докладывались на Всесоюзном семинаре "Лазеры в биологии и медицине" (ноябрь 1988 г., Москва), 15 Международной конференции по лазерному зондированию (Томск, июль 1990 г.), Всесоюзной конференции по люминесценции (Москва, март 1991 г.), II Международном симпозиуме "Комплексный глобальный мониторинг Мирового океана" (Ленинград, апрель 1991 г.), XIV Международной конференции по когерентной и нелинейной оптике (Санкт-Петербург, сентябрь 1991 г.), 12-ой Международной конференции по дистанционному зондированию (Сингапур, октябрь 1991 г.), на Симпозиуме по измерению первичной продукции океана (Ла Рошель, Франция, апрель 1992 г.), 3-ей конференции по квантовой электронике и лазерным наукам (CLEO/QELS '92, Анахайм, Калифорния, май 1992 г.).

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ (3 статьи и II тезисов докладов), еще 2 статьи приняты к печати.



### Содержание работы.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов и списка литературы. Каждая глава содержит введение, в котором формулируются основные задачи данной главы, и заключение, в котором приводятся основные результаты, полученные в главе.

Во введении обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются цели и задачи работы, кратко излагается содержание диссертации.

Первая глава посвящена обзору литературных данных о структурной и функциональной организации фотосинтетического аппарата водорослей и высших растений и механизмах формирования флуоресценции хлорофилла при оптическом возбуждении. Вводится понятие фотосинтезирующей единицы, основными элементами которой являются светособирающая антенна и реакционный центр (РЦ). Рассмотрена организация светособирающих комплексов и РЦ фотосистемы 2 (ФС2). Анализируются современные сведения о механизмах возникновения флуоресценции хлорофилла "a" *in vivo*, которая сопровождает процессы миграция энергии в первичных реакциях фотосинтеза, и включает два компонента: "постоянный" и "переменный", различающихся по своей природе [1]. Первый компонент формируется в процессе миграции экситонов по светособирающей антенне к РЦ ФС2, его квантовый выход определяется эффективностью этого процесса и не зависит от состояния РЦ и электронно-транспортной цепи. Переменный компонент флуоресценции возникает в результате рекомбинации зарядов в закрытых или неактивных РЦ ФС2. Величина его квантового выхода может варьироваться от нуля до трех-, четырехкратного значения выхода постоянной флуоресценции в зависимости от состояния РЦ ФС2 [1]. В главе изложены литературные данные о влиянии естественной

освещенности, условий минерального питания и других внешних факторов на состояние фотосинтетического аппарата и характеристики флуоресценции хлорофилла.

В этой главе приводятся также необходимые сведения об эффекте насыщения флуоресценции сложных органических соединений и комплексов, представителями которых являются и фотосинтезирующие организмы. Насыщение приводит к нелинейной зависимости интенсивности (и квантового выхода) флуоресценции от интенсивности зондирующего излучения и в случае фотосинтезирующих организмов проявляется уже при интенсивностях  $\sim 10$  кВт/см<sup>2</sup>. Обсуждаются результаты ранее проведенных теоретических и экспериментальных исследований насыщения флуоресценции хлорофилла "a" *in vivo*.

В заключение анализируется состояние развития методов дистанционного лазерного зондирования фитопланктона.

Вторая глава посвящена теоретическому и экспериментальному исследованию механизмов формирования флуоресценции хлорофилла "a" *in vivo* при импульсном лазерном возбуждении.

В §2.1 для описания миграции энергии в первичных реакциях фотосинтеза при импульсном фотовозбуждении предлагается модель, основанная на мультицентральной структуре фотосинтетического аппарата и учитывающая миграцию экситонов между различными фотосинтезирующими единицами, синглет-синглетную аннигиляцию экситонов, просветление пигментов, а также влияние различных состояний РЦ ФС2. В отличие от ранее предлагаемых моделей, учитываются изменения состояния РЦ под действием лазерного импульса. Определено соотношение скоростей миграции экситонов на РЦ ФС2 для различных его состояний.

В рамках данной модели проанализирован вклад различных механизмов насыщения флуоресценции и рассчитаны кривые насыщения



(зависимости интенсивности или выхода флуоресценции от интенсивности зондирующего излучения) постоянного и переменного компонентов флуоресценции хлорофилла "а".

Кривая насыщения флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo* определяется большим набором трудноизмеряемых параметров модели (концентрации, сечения поглощения и квантовый выход флуоресценции пигментов светособирающей антенны, скорости миграции экситонов по антенне к РЦ, размеры фотосинтезирующей единицы, параметры РЦ и др.). Это осложняет сопоставление теоретических и экспериментальных зависимостей и позволяет проводить только сравнение их формы [2], что является лишь косвенным подтверждением адекватности теоретической модели. Для непосредственной же ее проверки необходимо точное сопоставление теоретических и экспериментальных зависимостей. В настоящей работе показано, что такая задача может быть решена, если в качестве количественной меры интенсивности зондирующего лазерного импульса использовать величину среднего числа возбуждений, захватываемых реакционным центром ФС2 за время импульса ( $N_{RC}$ ). Для этого был разработан метод экспериментального определения  $N_{RC}$ , основанный на двухимпульсном лазерном возбуждении и описанный в §2.2.

В §2.3 описан лазерный спектрофлуориметр, собранный для реализации метода измерения величины  $N_{RC}$  и проведения экспериментальных исследований механизмов и особенностей формирования флуоресценции фитопланктона при наносекундном импульсном лазерном возбуждении.

§2.4 посвящен экспериментальной проверке различных теоретических моделей, описывающих формирование сигнала флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo*. Наилучшее совпадение экспериментальных и теоретических результатов получено для предложенной нами модели.

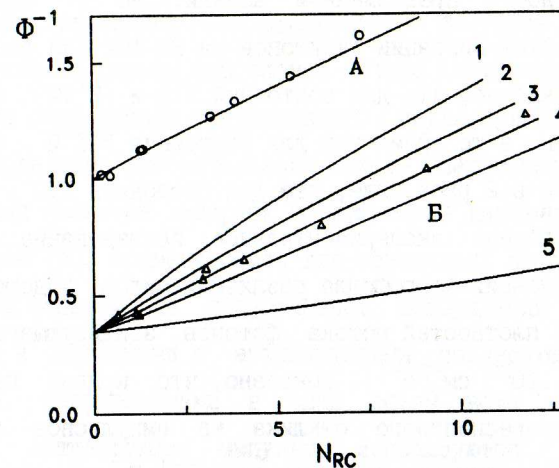


Рис.1. Кривые насыщения флуоресценции хлорофилла "а" для случая изначально открытых (А) и закрытых (Б) РЦ ФС2.

На рис.1 показаны кривые насыщения флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*, измеренные для случая изначально открытых (А) и закрытых (Б) РЦ ФС2 и построенные в координатах  $(\Phi^{-1}, N_{RC})$  (флуоресцентный параметр  $\Phi = I_{f1}/I_{Rs}$ , где  $I_{f1}$  и  $I_{Rs}$  - интенсивности флуоресценции хлорофилла и спонтанного комбинационного рассеяния воды, используемого в качестве "внутреннего репера" [3]). В первом случае флуоресценция включала только постоянный компонент, а во втором - как постоянный, так и переменный компоненты. Кривые 1,2,3,4 рассчитаны в рамках предложенной нами модели для различных значений отношения скоростей миграции экситонов на РЦ ФС2, находящихся в  $P^+I^-Q^-$  и  $PIQ^-$  состояниях,  $p_1/p_2 = 1, 0.7, 0.5, 0.3$  соответственно ( $P, I, Q$  - первичный донор P680, промежуточный акцептор феофитин и первичный хиноновый акцептор  $Q_A$  реакционного центра ФС2 соответственно). Кривая 5 рассчитана в рамках модели, предложенной в [2].

Применение метода измерения величины  $N_{RC}$  позволило не только



доказать адекватность предложенной модели, но и определить соотношение скоростей миграции экситонов на РЦ ФС2 для различных его состояний. Показано, что для состояний  $P^+IQ$  и  $P^+IQ^-$  скорости миграции одинаковы, в то время как для состояния  $P^+I^-Q^-$  скорость миграции экситонов в 2 раза ниже, чем для состояния  $P^+IQ^-$ .

В §2.5 проведено экспериментальное исследование эффекта насыщения флуоресценции хлорофилла различных видов водорослей в широком диапазоне плотностей потока фотонов зондирующего излучения ( $F = 10^{21} \dots 10^{25} \text{ см}^{-2}\text{с}^{-1}$ ). Показано, что кривая насыщения интегрального флуоресцентного отклика на импульсное лазерное возбуждение описывается в координатах  $\{\Phi^{-1}, I_{f1}\}$  в диапазоне плотностей потока фотонов  $F < 10^{25} \text{ см}^{-2}\text{с}^{-1}$  квадратичной зависимостью вида:

$$\Phi^{-1} = \Phi_0^{-1} + c_1 \cdot I_{f1} + c_2 \cdot I_{f1}^2.$$

Таким образом, по измерениям нескольких точек кривой насыщения при помощи квадратичной экстраполяции можно определить параметры всей кривой и, в частности, значение ненасыщенного флуоресцентного параметра  $\Phi_0 = \lim_{F \rightarrow 0} \Phi(F)$ , который используется для определения концентрации хлорофилла "а" в воде [4].

В третьей главе приводятся результаты исследований по разработке дистанционного лазерного метода определения относительного выхода переменной флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo*  $\eta = (\Phi^{\max} - \Phi^0) / \Phi^{\max}$ , где  $\Phi^0$  - начальный уровень интенсивности флуоресценции, а  $\Phi^{\max}$  - максимальный уровень, соответствующий полностью закрытым РЦ ФС2. Измерение  $\eta$  позволяет определять эффективность преобразования энергии света в первичных реакциях фотосинтеза [1], которая является хорошим индикатором эффективности работы всего фотосинтетического аппарата. Для большинства видов водорослей, находящихся в хорошем функциональном состоянии

величина  $\eta$  составляет 0.6-0.7 и снижается до 0.1-0.3 под воздействием различных неблагоприятных факторов [1]. В §3.1 кратко проанализированы контактные методы измерения  $\eta$ . В §3.2 обсуждаются особенности предложенного двухимпульсного лазерного метода определения относительного выхода переменной флуоресценции, который является лазерной модификацией двухимпульсной ламповой методики [5], применяющейся для контактных измерений в пробах воды. Метод основан на попеременном возбуждении фитопланктона одиночными и сдвоенными с активирующими зондирующими лазерными импульсами, направляемыми в один объем воды с определенной задержкой. Активирующие импульсы используются для перевода изначально открытых РЦ ФС2 в закрытое состояние. В первом случае регистрируется начальный уровень флуоресценции  $\Phi^0$ , а во втором - максимальный уровень  $\Phi^{\max}$  в ответ на зондирующие импульсы.

В §3.3 приводятся результаты лабораторных экспериментов по оптимизации режимов двухимпульсного лазерного возбуждения. Показано, что для корректного определения относительного выхода переменной флуоресценции хлорофилла режимы возбуждения должны удовлетворять следующим требованиям.

Во-первых, величина плотности потока фотонов активирующего импульса в зондируемом объеме воды должна быть не менее  $5 \cdot 10^{22} \text{ см}^{-2}\text{с}^{-1}$  для того, чтобы инициированные его действием процессы привели к переходу большей части первоначально открытых РЦ ФС2 в закрытое состояние.

Во-вторых, задержка между активирующим и зондирующим импульсами должна составлять 30-50 мкс, чтобы за это время успели дезактивироваться тушители флуоресценции, индуцированные активирующим импульсом, но в то же время восстановленный первичный хиноновый акцептор  $Q_A$  не успел окислиться вторичным акцептором  $Q_B$ .



В-третьих, плотность потока фотонов зондирующего импульса в зондируемом объеме должна быть меньше  $10^{22} \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$  для того, чтобы не проявлялся эффект насыщения флуоресценции, механизмы и проявление которого различны для постоянной и переменной флуоресценции.

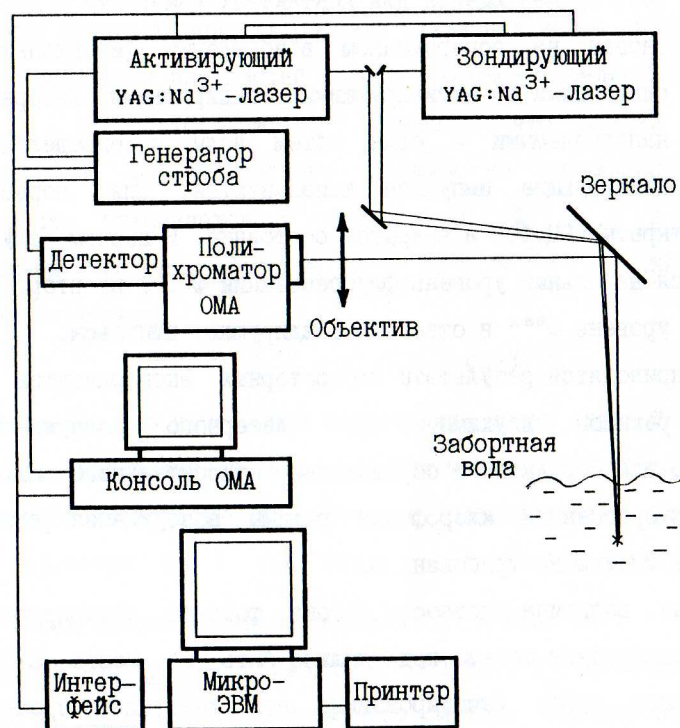


Рис.2. Блок-схема лидара для дистанционного лазерного зондирования концентрации хлорофилла "а" и фотосинтетической активности фитопланктона.

В §3.4 описаны аппаратура и методика дистанционного лазерного мониторинга фотосинтетической активности и концентрации хлорофилла "а" фитопланктона. В состав лидарного комплекса

(рис.2) входят следующие блоки и системы: два импульсных YAG:Na<sup>3+</sup>-лазера с модуляцией добротности и удвоением частоты, работающих синхронно с регулируемой задержкой 2...150 мкс, юстировочная оптическая система, оптический многоканальный анализатор (ОМА) и микро-ЭВМ, сопряженная с перечисленными приборами. Первый и второй лазеры излучают активирующие и зондирующие импульсы с импульсной мощностью 3 и 0.6 МВт и частотой повторения 5 и 10 Гц соответственно. Длительность импульсов - 10 нс, длина волны излучения - 532 нм, расходимость -  $5 \cdot 10^{-3}$  рад. Перечисленные характеристики лазеров обеспечивают требуемые режимы возбуждения флуоресценции фитопланктона при расстоянии до поверхности воды 10-15 м в слое толщиной 3-6 м. Микро-ЭВМ обеспечивает полностью автоматизированный режим работы комплекса и обработку поступающей из ОМА спектральной информации.

В §3.5 приводятся результаты натуральных применений лазерного метода определения фотосинтетической активности фитопланктона в ходе морских экспедиций в Северо-Западной Атлантике и Средиземном море.

Четвертая глава посвящена лабораторным и натурным исследованиям по функциональной диагностике фитопланктона с помощью разработанных методов.

Различные факторы внешнего воздействия приводят к разным структурным и функциональным изменениям фотосинтетического аппарата, что отражается и на параметрах флуоресценции хлорофилла "а". Под влиянием неблагоприятных для фотосинтезирующих организмов факторов (недостаток биогенных элементов, присутствие гербицидов, токсикантов и др.) происходит снижение фотосинтетической активности  $\eta$ , сопровождаемое увеличением квантового выхода и времени жизни флуоресценции. Как показали исследования этого



явления традиционными методами ламповой флуориметрии, пикосекундной кинетической спектроскопии и др. [1], изменения параметров флуоресценции во всех случаях оказываются практически одинаковыми, что не позволяет решить вопрос о причинах снижения фотосинтетической активности клеток этими методами. Одной из задач данной главы была попытка решить эту задачу на основе анализа нелинейных параметров лазериндуцированной флуоресценции хлорофилла.

Важным звеном в решении задач функциональной диагностики фотосинтезирующих организмов является выделение вкладов "постоянного" и "переменного" (рекомбинационного) компонентов в изменениях флуоресценции хлорофилла "a". В §4.1 показано, что такая задача может быть решена методом импульсной лазерной флуориметрии путем измерения и обработки кривых насыщения флуоресценции. В основе предлагаемой методики лежит различная природа насыщения постоянного и переменного компонентов флуоресценции и, в частности, более быстрое насыщение последнего с ростом интенсивности зондирующего излучения.

В §4.2 приводятся результаты изучения механизмов увеличения квантового выхода флуоресценции фитопланктона при недостатке минерального питания. Применение лазерной флуориметрии насыщения позволило установить, что этот процесс обусловлен увеличением выхода как переменного, так и постоянного компонентов флуоресценции хлорофилла "a" *in vivo*. Первый, рекомбинационный компонент, относительная величина которого составляет 60...75% в общем изменении флуоресценции, обусловлен нарушением транспорта электрона в РЦ ФС2 между промежуточным акцептором феофитином (I) и первичным хиноновым акцептором  $Q_A$ . Второй, нерекомбинационный компонент, относительная величина которого в общем изменении

флуоресценции - 25...40%, связан с ослаблением связи между светособирающей антенной и РЦ ФС2 или нарушением транспорта электронов между первичным донором P680 и I. Показано, что недостаток минерального питания приводит также к появлению небольшого (не более 15%) количества неактивных РЦ ФС2 с нарушенным переносом электрона от  $Q_A$  к вторичному хиноновому акцептору  $Q_B$ .

В §4.3 приводятся результаты натуральных и лабораторных исследований механизмов световой регуляции квантового выхода флуоресценции хлорофилла "a" *in vivo*. Применение двухимпульсной лазерной методики позволило впервые исследовать *in situ* тонкую структуру суточного ритма интенсивности переменного и постоянного компонентов флуоресценции и фотосинтетической активности фитопланктона. На рис.3 изображены кривые суточного ритма начального уровня интенсивности флуоресценции фитопланктона ( $\Phi^0$ ), максимального уровня ( $\Phi^{max}$ ) и относительного выхода переменной флуоресценции ( $\eta = (\Phi^{max} - \Phi^0) / \Phi^{max}$ ), измеренные *in situ* с помощью дистанционной двухимпульсной методики на трехсуточной станции в Тирренском море. В результате натуральных и лабораторных исследований было установлено, что основными механизмами световой регуляции квантового выхода флуоресценции фитопланктона *in situ* являются фотоингибирование первичных стадий фотосинтеза и энергизационное тушение переменного компонента флуоресценции хлорофилла "a" под действием изменений естественной освещенности в приповерхностном слое воды. Выявлена связь параметров суточного ритма выхода флуоресценции хлорофилла с фотосинтетической активностью фитопланктона. Показано, что по мере ухудшения функционального состояния фитопланктона увеличивается глубина модуляции (отношение максимальной к минимальной интенсивности



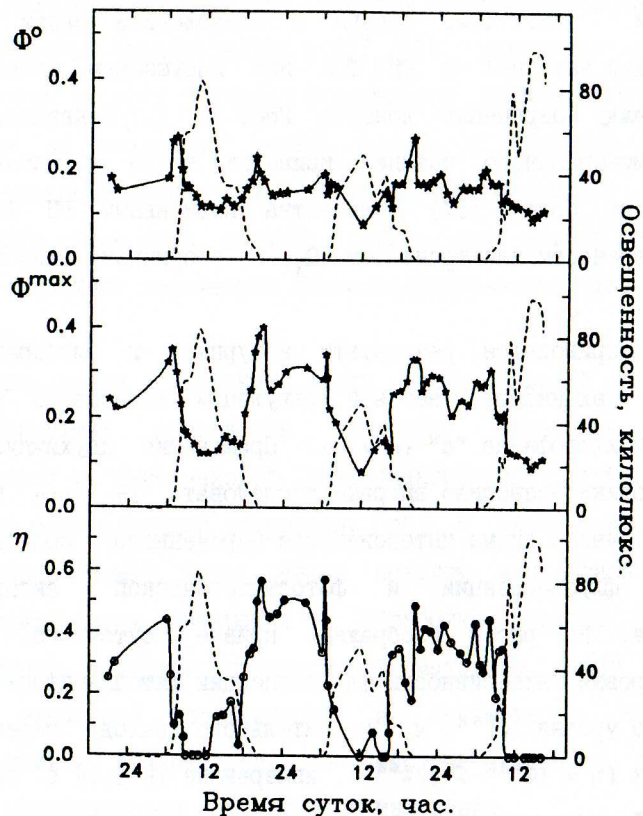


Рис.3. Кривые суточного ритма начального уровня интенсивности флуоресценции фитопланктона ( $\Phi^0$ ), максимального уровня ( $\Phi^{\max}$ ) и фотосинтетической активности  $\eta$ , измеренные *in situ* с помощью дистанционной двухимпульсной лазерной методики. Пунктирной линией показаны изменения естественной освещенности приповерхностного слоя воды.

флуоресценции) суточного ритма флуоресценции.

В §4.4 приводятся результаты исследования влияния различных токсикогенных факторов (гербицидов типа диурона, ионов тяжелых металлов, жирных кислот) на параметры лазероиндуцированной

флуоресценции фитопланктона. Применение лазерной флуориметрии насыщения позволило установить, что трех-, четырехкратное увеличение выхода флуоресценции при добавлении диурона включает только рекомбинационный компонент, и подтвердило хорошо известный факт, что диурон блокирует транспорт электрона в РЦ ФС2 между первичным ( $Q_A$ ) и вторичным ( $Q_B$ ) хиноновыми акцепторами.

Показано, что под воздействие ионов тяжелых металлов ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ), происходят сильные изменения характеристик насыщения флуоресценции хлорофилла "а", сопровождающиеся снижением фотосинтетической активности водорослей. При этом происходит уменьшение константы синглет-синглетной аннигиляции экситонов в светособирающей антенне, а также специфическое разгорание длинноволновой полосы флуоресценции хлорофилла "а" (в области 710-750 нм). Полученные результаты свидетельствуют о том, что под воздействием ионов тяжелых металлов происходят серьезные структурные изменения в светособирающей антенне фотосинтетического аппарата, приводящие к нарушению или ослаблению связи между отдельными полипептидами светособирающего комплекса.

Исследование разгорания флуоресценции и изменения параметров насыщения флуоресценции под воздействием олеиновой кислоты показало, что наблюдаемое увеличение флуоресценции включает только нереккомбинационный компонент, что свидетельствует, вероятно, о нарушении связи светособирающей антенны с РЦ ФС2.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было установлено, что воздействие различных неблагоприятных для фотосинтеза внешних факторов вызывает разные, специфические изменения параметров лазероиндуцированной флуоресценции хлорофилла, что позволяет селективно идентифицировать факторы, неблагоприятно воздействующие на фотосинтетический аппарат



фитопланктона, методами импульсной лазерной флуориметрии.

В пятой главе приводятся результаты дистанционного лазерного мониторинга морского фитопланктона.

В §5.1 анализируются проблемы корректного определения концентрации хлорофилла "а" и фотосинтетической активности фитопланктона по результатам дистанционного лазерного зондирования. Решение этих проблем осложняется рядом обстоятельств, обусловленных как особенностями воздействия мощного импульсного лазерного излучения на фотосинтетический аппарат водорослей, так и спецификой самого объекта. Первая группа обстоятельств связана, в первую очередь, с проявлением эффекта насыщения флуоресценции, а вторая - с влиянием изменений функционального состояния фитопланктона на выход флуоресценции хлорофилла. Наиболее сильным проявлением такого влияния является суточный ритм флуоресценции фитопланктона, вызванный изменениями естественной освещенности, в результате которого величина квантового выхода флуоресценции может изменяться в 3-4 раза в течение суток, что необходимо учитывать при обработке результатов флуоресцентного мониторинга на протяженных акваториях, когда измерения проводятся в течение нескольких дней.

На основе изучения механизмов и особенностей суточного ритма флуоресценции фитопланктона был разработан и апробирован в натурных исследованиях экспрессный алгоритм коррекции данных дистанционного флуоресцентного мониторинга с учетом суточного ритма квантового выхода флуоресценции хлорофилла "а".

В §5.2 приводятся результаты дистанционного лазерного мониторинга фитопланктона в Северо-Западной Атлантике и Средиземном море. Общая протяженность трассы дистанционного зондирования, проведенного во время экспедиций, составила 12000 км. В ходе

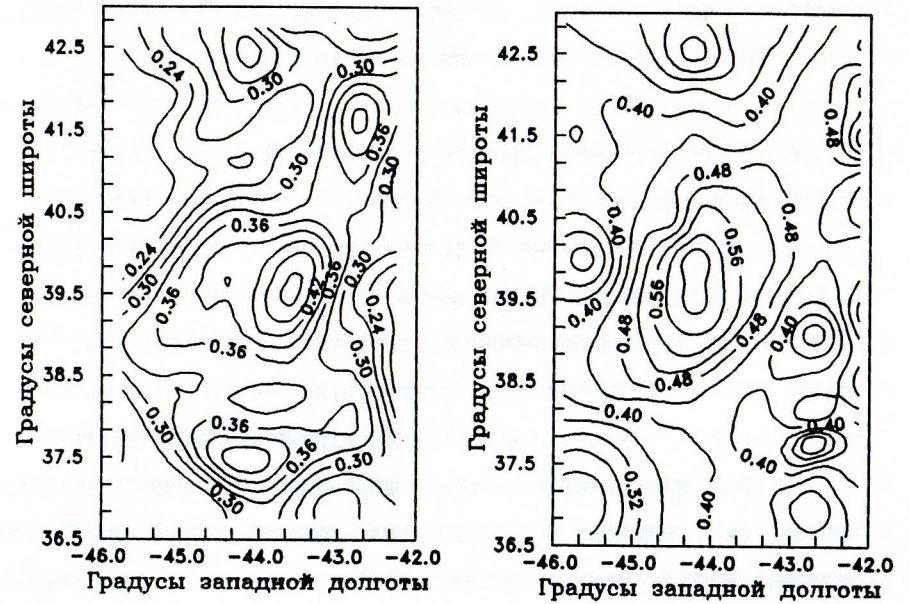


Рис.4. Схемы горизонтального распределения концентрации хлорофилла "а" (а) и фотосинтетической активности  $\eta$  (b) приповерхностного фитопланктона на акватории размером 500×300 км в Северо-Западной Атлантике (май 1990 г.).

экспедиционных работ исследовались вопросы пространственной изменчивости распределений фитопланктона в локальном, мезо- и синоптическом масштабах, пятнистости этих распределений, корреляции пространственного распределения ФП с гидрологическими структурами. На рис.4 показаны схемы горизонтального распределения концентрации хлорофилла "а"  $C_{chl}$  (рис.4а) и фотосинтетической активности  $\eta$  (4b) приповерхностного фитопланктона на акватории размером 500×300 км в Северо-Западной Атлантике (май 1990 г.). Эти распределения были построены по результатам лазерного флуоресцентного мониторинга и скорректированы с учетом суточного ритма квантового выхода флуоресценции и фотосинтетической



активности фитопланктона. Не останавливаясь на детальном анализе этих распределений, отметим значительную изменчивость  $C_{chl}$  и  $\eta$  не только синоптического (~100 км), но и мезомасштаба (~10 км). Сравнение распределений приповерхностного фитопланктона с гидрологическими данными показало высокую корреляцию распределения фотосинтетической активности фитопланктона с глубинными гидрологическими структурами. В частности, области высокой активности совпадали с антициклоническими вихревыми образованиями, в то время как области низкой активности - с циклоническими образованиями, обнаруженными в ходе гидрологической съемки.

В §5.3 приводятся результаты дистанционного лазерного зондирования фитопланктона и органических примесей в прибрежной части Черноморского побережья России в августе 1991 г.. Анализируются особенности горизонтальных распределений концентрации хлорофилла "а" и органических примесей и их связь с источниками антропогенных и природных загрязнений моря.

В заключении приводятся основные результаты, полученные в диссертационной работе:

I. Для описания процессов формирования флуоресценции хлорофилла "а" *in-vivo* при импульсном фотовозбуждении предложена теоретическая модель, основанная на мультицентральной структуре фотосинтетического аппарата, учитывающая миграцию экситонов между соседними фотосинтезирующими единицами, синглет-синглетную аннигиляцию экситонов, а также влияние изменений состояния реакционных центров фотосистемы 2 (РЦ ФС2) под действием лазерного импульса. Для экспериментального обоснования модели разработан метод измерения величины среднего числа экситонов, захватываемых РЦ ФС2 во время импульса. Применение этого метода позволило дока-

зать адекватность предложенной модели и определить соотношения скоростей миграции экситонов на РЦ ФС2 при различных его состояниях.

2. Разработан и применен в лабораторных и натурных исследованиях дистанционный лазерный метод определения относительного выхода переменной флуоресценции хлорофилла "а" *in-vivo*.

3. Создан автоматизированный двухимпульсный лидар, позволяющий проводить дистанционные измерения концентрации хлорофилла "а" и фотосинтетической активности фитопланктона с борта судна с высоким пространственным разрешением.

4. Разработан метод разделения вкладов рекомбинационного и нерекомбинационного компонентов в изменениях флуоресценции хлорофилла "а" *in vivo*, основанный на анализе кривых насыщения флуоресценции.

5. Показано, что увеличение квантового выхода флуоресценции хлорофилла "а" фитопланктона при недостатке минерального питания включает два компонента. Первый, рекомбинационный компонент, относительная величина которого составляет 60...75%, обусловлен нарушением транспорта электрона в РЦ ФС2 между промежуточным акцептором феофитином I и первичным хиноновым акцептором  $Q_A$ . Второй, нерекомбинационный компонент, относительная величина которого - 25...40%, связан с ослаблением связи между светособирающей антенной и РЦ ФС2 или нарушением транспорта электронов между первичным донором РЦ P680 и I.

6. Исследованы в натуральных условиях механизмы регуляции фотосинтетической активности фитопланктона *in situ* и квантового выхода флуоресценции хлорофилла "а" при изменениях естественной освещенности. Показано, что для приповерхностного фитопланктона основными механизмами световой регуляции являются фотоингибиро-



ние первичных стадий фотосинтеза и энергизационное тушение переменного компонента флуоресценции.

7. Разработан и апробирован в натуральных исследованиях экспрессный алгоритм коррекции данных дистанционного флуоресцентного мониторинга на суточный ритм флуоресценции хлорофилла "а".

8. Показано, что разработанные методы импульсной лазерной флуориметрии позволяют селективно идентифицировать внешние факторы, неблагоприятно воздействующие на фотосинтетический аппарат.

#### Публикации по теме диссертации

1. Горбунов М.Ю., Чекалюк А.М. Влияние естественной освещенности на эффективность флуоресценции фитопланктона при лазерном возбуждении. // В кн.: "Лазеры в народном хозяйстве" - М.: МДНТП, 1989, с. 93-96.

2. Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. Метод дистанционного лазерного мониторинга эффективности фотосинтеза фитопланктона. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия, 1991, т.32, №6, с.63-71.

3. Бунин Д.К., Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. Формирование флуоресценции хлорофилла а *in-vivo* при наносекундном импульсном лазерном возбуждении // Квантовая электроника, 1992, т.19, № 5, с.421-423.

4. Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. Применение метода лазерной флуориметрии насыщения для исследования механизмов разгорания флуоресценции хлорофилла "а" фитопланктона при недостатке минерального питания. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия, 1992, т.33, № 4 (принято к печати).

5. Горбунов М.Ю., Чекалюк А.М. Исследование механизмов световой регуляции квантового выхода флуоресценции фитопланктона *in situ* методами импульсной лазерной флуориметрии. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия, 1992, т.33, № 4 (принято к печати).

6. M.Yu.Gorbunov, I.G.Ivanov, V.V.Fadeev, A.M.Chekalyuk,

E.A.Chernyavskaya. Laser remote diagnostics of phytoplankton // "15th International Laser Radar Conference, July 23-27, 1990, Tomsk, Abstracts of papers" Part II, pp. 16-20.

7. M.Yu.Gorbunov, V.V.Fadeev, A.M.Chekalyuk. Detection of the phytoplankton fluorescence diurnal rhythm at remote sensing // "15th International Laser Radar Conference, July 23-27, 1990, Tomsk, Abstracts of papers" Part II, pp. 28-30.

8. Горбунов М.Ю., Чекалюк А.М. Функциональная диагностика фотосинтезирующих организмов методом лазерной флуориметрии насыщения. // В сб.: "Тезисы докладов Всесоюзной конференции по люминесценции, посвященной 100-летию со дня рождения С.И.Вавилова. 26-28 марта 1991 г." - М.: ОНТИ ФИАН, 1991, с. 102.

9. Демидов А.А., В.В.Фадеев, А.М.Чекалюк, Горбунов М.Ю. Лазерная диагностика морского фитопланктона в системе глобального мониторинга Мирового океана. // В сб.: "Тезисы докладов II Международного симпозиума "Комплексный глобальный мониторинг Мирового океана" (МОНОК-II). 14-21 апреля 1991 г., Ленинград".

10. Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. О механизмах формирования флуоресцентного отклика фотосинтезирующих организмов на импульсное лазерное возбуждение. // В сб.: "Тезисы докладов XIV Международной конференции по когерентной и нелинейной оптике. Ленинград, 24-27 сентября 1991 г.", т.2, с.70.

11. Chekalyuk A.M., Gorbunov M.Yu. Laser method for remote sensing of phytoplankton photosynthetic activity *in-situ*. // In "Proceedings of 12th Asian Conference on Remote Sensing. Singapore, Oct.30 - Nov.5, 1991", pp. Q-13-1 - Q-13-5.

12. Chekalyuk A.M., Demidov A.A., Fadeev V.V., Gorbunov M.Yu. Shipboard lidar investigations of marine phytoplankton. // In "Proceeding of the ICES Symposium on Measurement of Primary Production from the Molecular to the Global Scale, La Rochelle, France, 21-24 April, 1992".

13. Chekalyuk A.M., Gorbunov M.Yu. Laser *in-situ* remote measurements of the phytoplankton photosynthetic activity // In "Proceeding of the ICES Symposium on Measurement of Primary Production from the Molecular to the Global Scale, La Rochelle, France, 21-24 April, 1992".



I4. Chekalyuk A.M., Gorbunov M.Yu. Some problems of phytoplankton characteristics estimation by lidar remote sensing of the in-vivo chlorophyll fluorescence" // In "Proceeding of the ICES Symposium on Measurement of Primary Production from the Molecular to the Global Scale, La Rochelle, France, 21-24 April, 1992".

I5. Chekalyuk A.M., Fadeev V.V., Gorbunov M.Yu. Theoretical and experimental study of laser-induced in-vivo chlorophyll fluorescence. // In "Proceedings of the 3-d Quantum Electronics and Laser Science Conference (CLEO/QELS'92), Anaheim, California, 10-15 May, 1992", QThD27.

I6. Chekalyuk A.M., Gorbunov M.Yu. Laser remote sensing of phytoplankton photosynthetic activity in-situ: new technique and applications. // In "Proceedings of the 3-d Quantum Electronics and Laser Science Conference (CLEO/QELS'92), Anaheim, California, 10-15 May, 1992", QThD25.

#### Цитированная литература

1. Рубин А.Б., Кононенко А.А., Пашенко В.З., Чаморовский С.К., Венедиктов П.С. Принципы регуляции и модельные системы первичных процессов фотосинтеза // Итоги науки и техники - М.: ВИНТИ, 1987, Сер. биофизика, т.22.
2. Иванов И.Г. Лазерно-спектроскопические методы количественного определения и диагностики фотосинтезирующих примесей в водных средах - Дисс....канд.физ.-мат.наук, Москва, МГУ, 1987.
3. Клышко Д.Н., Фадеев В.В. Дистанционное определение примесей в воде методом лазерной спектроскопии с калибровкой по комбинационному рассеянию. // Докл. АН СССР, 1978, т.238, №2, с.320-323.
4. Фадеев В.В. Лазерная спектроскопия водных сред - Дисс.... докт. физ.-мат. наук, Москва, МГУ, 1983.
5. Falkowski P.G., Kiefer D.A. Chlorophyll "a" fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass // J. Plankt. Res., 1985, v.7, p.715-731.