

ЛАЗЕРНЫЙ ON-LINE СЕНСОР ЗАГРЯЗНЕНИЙ ПРИРОДНЫХ ВОД, ИСПОЛЬЗУЮЩИЙ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ОРГАНИЗМЫ В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОИНДИКАТОРОВ

Т. С. Гостев, Ф. И. Кузьминов, С. А. Моисеев

*В работе показана возможность использования фотосинтезирующих организмов в качестве флуоресцентного сенсора присутствия экотоксикантов в природных водах. Она основана на высокой чувствительности молекулярных фотофизических параметров хлорофилла *a*, определяемых методом нелинейной лазерной флуориметрии, к физиологическому состоянию фотосинтетического аппарата. Для экспериментальной апробации предложенного подхода проведены лабораторные исследования зависимости фотофизических параметров микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa* от присутствия гербицидов и ионов тяжелых металлов.*

Ключевые слова: нелинейная лазерная флуориметрия, хлорофилл *a*, загрязнение вод.

Использование естественных компонентов экосистемы в качестве индикаторов ее состояния является наиболее современной стратегией экологического мониторинга. Большие возможности для биоиндикации [1] представляют фотосинтезирующие организмы – благодаря высокой чувствительности к изменениям в окружающей системе: присутствию загрязнителей, климатическим изменениям, изменению светового режима. Вместе с тем, фотосинтезирующие организмы – весьма сложный для исследования объект, и выявление параметров фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительных к изменению внешних условий, а также комплексное их измерение в on-line режиме до сих пор представляет трудную задачу.

В работе показана принципиальная возможность использования фитопланктона в качестве on-line сенсора загрязнений природных вод – возможность, основанная на по-

Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, ГСП-1, строение 62; e-mail: onewhowaits@mail.ru.

вом подходе, использующем фотофизические параметры молекулы хлорофилла *a*, которые определяются методом нелинейной лазерной флуориметрии [2]. Одним из основных отличий данной методики от существующих классических (не лазерных) оптических методов [3] исследования и мониторинга фотосинтезирующих организмов является возможность определения параметров на молекулярном уровне. Другая существенная особенность метода нелинейной флуориметрии – параллельное определение до четырех фотофизических параметров за одно измерение.

В основе данного метода лежит использование импульсного лазерного излучения высокой плотности мощности для возбуждения флуоресценции молекул хлорофилла *a*. При этом в фотосинтетическом аппарате проявляются фотофизические эффекты [4], не наблюдаемые в других методах в связи с низкой плотностью потока возбуждающего излучения, такие, как синглет-синглетная аннигиляция возбужденных состояний молекул хлорофилла *a* и динамическое обеднение их основного состояния. Эти эффекты приводят к тому, что зависимость числа фотонов флуоресценции N_{fl} от плотности потока фотонов возбуждающего излучения F становится нелинейной – наблюдается насыщение флуоресценции.

Для описания флуоресцентного отклика фотосинтетического аппарата на мощное импульсное лазерное излучение используется четырехпараметрическая модель: ход кривой насыщения определяется значениями четырех обобщенных (каждый из них характеризует сразу несколько различных процессов) молекулярных фотофизических параметров: σ – сечение возбуждения молекул хлорофилла *a*, учитывающее как прямое поглощение света молекулами хлорофилла *a*, так и перенос на них энергии с молекул вспомогательных пигментов; τ – время жизни возбужденного состояния молекул хлорофилла *a*, учитывающее все каналы распада возбуждения, за исключением синглет-синглетной аннигиляции; γn_0 – скорость синглет-синглетной аннигиляции возбужденных состояний молекул хлорофилла *a* (n_0 – локальная концентрация молекул хлорофилла *a*), Φ_0 – нормированная интенсивность флуоресценции в отсутствие насыщения.

Населенность первого возбужденного состояния молекул хлорофилла *a* в рамках этой модели определяется выражением:

$$\frac{dn(t, r)}{dt} = F(t, r) \cdot \sigma \cdot (n_0 - n(t, r)) - \frac{n(t, r)}{\tau} - \gamma \cdot n^2(t, r). \quad (1)$$

Число фотонов флуоресценции из возбуждаемого объема среды дается выражением:

$$N_{fl} = k_{fl} \times \int_V \int \int d^2\vec{r} dz \int_{-\infty}^{\infty} n(\vec{r}, z, t; F, \sigma, \tau, n_0) dt, \quad (2)$$

здесь k_{fl} – скорость излучательного распада возбужденных состояний молекул хлорофилла a , \vec{r} – координата в поперечном сечении лазерного импульса, z – координата вдоль направления распространения лазерного импульса, V – объем, из которого принимается флуоресцентный сигнал, $n(\vec{r}, z, t; F, \sigma, \tau, n_0)$ – решение кинетического уравнения (1).

В предыдущих работах показана высокая чувствительность параметров предложенной модели к состоянию фотосинтетического аппарата [5].

Для демонстрации принципиальной возможности использования фитопланктона в качестве биоиндикатора загрязнений природных вод были проведены лабораторные эксперименты по определению молекулярных фотофизических параметров водорослей *Chlorella pyrenoidosa* в присутствии гербицида диурона и ионов меди Cu^{2+} в различных концентрациях. Экспериментальная установка использует для возбуждения твердотельный импульсный лазер со следующими параметрами: длительность импульсов – 25 нс, длина волны излучения – 532 нм, энергия в импульсе – до 12 мДж. Плотность потока фотонов в возбуждающем излучении может варьироваться от 10^{21} до 10^{25} $\text{см}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Ниже приведены экспериментально определенные фотофизические параметры клеток фитопланктона.

Т а б л и ц а 1

Значения фотофизических параметров *Chlorella pyrenoidosa* в присутствии ионов меди, ингибитора цепи транспорта электронов диурона (DCMU), а также для контрольного образца

Образец	$\tau, 10^{-9}$ с	$\sigma, 10^{-16}$ см^2	$\gamma n_0, 10^{12}$ с^{-1}
Контроль	0.18	2.2	2.6
$\text{Cu}^{2+} 10^{-9}$ М	0.21	2.1	1.6
DCMU 10^{-7} М	0.46	1.8	0.8

Полученные результаты показывают, что фотофизические параметры молекул хлорофилла зависят от физиологического состояния фитопланктона, и их изменение коррелирует с наличием различных загрязняющих веществ: присутствие ионов меди в воде,

даже в столь низкой концентрации, заметно сказывается на величине скорости синглет-синглетной аннигиляции, но лишь немного меняет значения двух остальных параметров; диурон вызывает сильное изменение как времени жизни возбужденного состояния хлорофилла *a* (что является известным фактом, имеющим установившуюся биофизическую трактовку), так и скорости синглет-синглетной аннигиляции. Исследование механизмов обнаруженного влияния металлов и гербицидов на скорость синглет-синглетной аннигиляции, которое может быть связано в первую очередь с конформационными изменениями в фотосинтетическом аппарате, представляет существенный интерес для биофизики фотосинтеза, и важно для разработки научных основ метода биоиндикации.

В работе показана перспективность использования фитопланктона в качестве флуоресцентного биосенсора для определения присутствия в воде ионов тяжелых металлов и гербицидов в концентрациях ниже предельно допустимых, если информационными характеристиками являются молекулярные фотофизические параметры, определяемые методом лазерной нелинейной флуориметрии. Возможна реализация предложенного метода биоиндикация и в дистанционном режиме.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] S. Mishra, S. Agrawal, *Ecotoxicology and environmental safety* **72**(2), 610 (2009).
- [2] В. В. Фадеев, Г. Л. Рубин, Я. В. Увенков, Лазерная диагностика фотосинтезирующих организмов методом флуориметрии насыщения в сб.: *Физические проблемы экологии (экологическая физика)*, № 2 (М., Изд. физического ф-та МГУ, 1998), с. 101.
- [3] M. Gorbunov, P. Falkowski, Fluorescence induction and relaxation (FIRe) technique and instrumentation for monitoring photosynthetic processes and primary production in aquatic ecosystems. In: "Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives" – Proceedings of XIII International Congress of Photosynthesis, 2004, Montreal, Canada (Allen Press, Montreal, 2004), vol. 2, p. 1029.
- [4] V. Fadeev, T. Dolenko, E. Filippova, V. Chubarov, *Optics Communications* **166**, 25 (1999).
- [5] D. Maslov, V. Fadeev, E. Ostroumov, S. Burikov, *EARSeL e-Proceedings* **3**(3), 306 (2004).

По материалам 3 Всероссийской молодежной школы-семинара "Инновационные аспекты фундаментальных исследований по актуальным проблемам физики", Москва, ФИАН, октябрь 2009 г.

Поступила в редакцию 16 декабря 2010 г.