

ОПТИКА КЛАСТЕРОВ, АЭРОЗОЛЕЙ И ГИДРОЗОЛЕЙ

УДК 534.36; 574.583

Спектр показателей поглощения и внутриклеточная концентрация пигментов цианобактерий на примере *Spirulina platensis*

Л.Е. Парамонов*

Институт океанологии им. П.П. Ширшова, Южное отделение
353467, г. Геленджик, ул. Просторная, 1г

Поступила в редакцию 28.08.2017 г.

В работе рассматривается и обосновывается аналитическая в явном виде оценка сечения поглощения однородных слабопреломляющих несферических частиц и их взвесей. На примере *Spirulina platensis* реализован способ оценки спектра показателей поглощения пигментов в области фотосинтетически активной радиации, исключающий использование экстрактов пигментов. Исследуется влияние распределения размера и формы клеток на спектры поглощения. Оценивается внутриклеточная концентрация хлорофилла *a*, фикоэритрина и фикоцианина.

Ключевые слова: спектр показателей поглощения, *Spirulina platensis*, внутриклеточная концентрация пигментов, хлорофилл *a*, фикоцианин, фикоэритрин; spectrum of absorption coefficients, *Spirulina platensis*, intracellular concentration of pigments, chlorophyll *a*, phycocyanin, phycoerythrin.

Введение

Свет — это источник энергии для всего живого на Земле, а также источник информации о процессах, происходящих в природных и искусственных средах. Селективное поглощение света пигментами фитопланктона — один из основных факторов изменения оптических свойств океанических и прибрежных вод. Спектральные свойства поглощения света фитопланктоном составляют основу различных биооптических алгоритмов исследования фитопланктона и моделей первичной продукции [1–4], в том числе и с использованием дистанционных методов. При интерпретации данных важно знать 1) спектр показателей поглощения пигментов фитопланктона [5, 6] и 2) вариации коэффициентов поглощения взвесей клеток фитопланктона, обусловленных эффектом упаковки [7], с учетом распределения последних по размерам и форме. Для корректного решения этих задач необходима адекватная оценка сечений поглощения для клеток фитопланктона разнообразных форм и размеров.

В настоящей статье рассматривается и обосновывается аналитическая в явном виде оценка сечения поглощения однородных слабопреломляющих несферических частиц произвольной формы и их взвесей.

Объектом исследования является *Spirulina platensis*. Цели работы — определение показателей поглощения смеси пигментов в фотосинтетически активной области спектра, оценка поглощательной способности единицы объема клетки в зависимости от распределения по размеру и форме клеток суспензии.

Определение внутриклеточной концентрации хлорофилла *a*, фикоэритрина и фикоцианина основано на разложении спектра показателей поглощения на гауссианы [8] и литературных данных об удельных показателях поглощения в локальных максимумах поглощения пигментов [5, 9].

Для оценки спектра показателей поглощения смеси пигментов *Spirulina platensis* $\alpha(\lambda)$ в видимой области ($400 \leq \lambda \leq 700$ нм) взвесь клеток была подвергнута воздействию ультразвукового дезинтегратора при частоте 1 МГц, при этом изменялась площадь поверхности клеток, а объем оставался неизменным. Спектры поглощения смеси до и после воздействия измерялись спектрофотометром СФ-14 [10] (рис. 1).

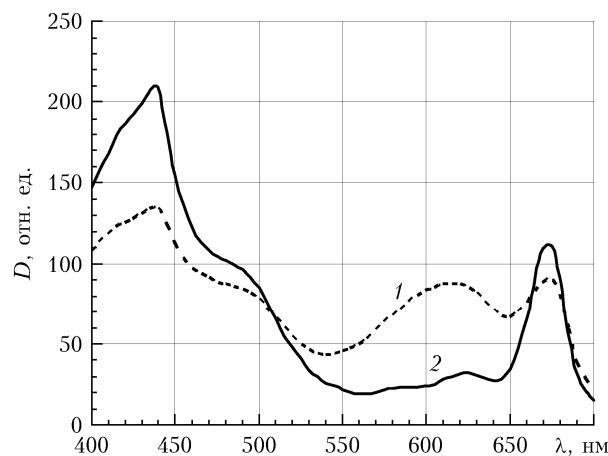


Рис. 1. Спектры поглощения взвеси нативных клеток *Spirulina platensis* до (1) и после ультразвукового воздействия (2). Значения приводятся в относительных единицах оптической плотности *D*

* Леонид Евгеньевич Парамонов (lparamonov@yandex.ru).

Необходимое для корректного применения нижеприведенных формул условие однократного рассеяния достигалось за счет уменьшения концентрации клеток при аддитивности результатов измерений. В качестве модели цианобактерии была использована клетка цилиндрической формы.

Теоретические основания

Для оценки сечений поглощения водных суспензий биологических клеток используем приближение аномальной дифракции [11].

Пусть направление падающего излучения совпадает с осью z . Обозначим через $l = l(x, y)$ длину отрезка луча, прошедшего через частицу и точку (x, y) , принадлежащую проекции частицы на плоскость, ортогональную направлению падающего излучения. Центр частицы совпадает с началом координат. Сечение поглощения одиночной частицы в приближении аномальной дифракции имеет вид [11]:

$$C_{\text{abs}} = \iint_G (1 - e^{2\text{Re}(i\sigma)}) dG, \quad (1)$$

где $\sigma = k(m_r - 1)l(x, y)$ – фазовый сдвиг луча, прошедшего через частицу, $k = 2\pi/\lambda$ – волновое число, $m_r = n_r + i\chi$ – относительный показатель преломления частицы. Воспользуемся теоремой о среднем, чтобы оценить интеграл (1):

$$C_{\text{abs}} = \iint_G (1 - e^{2\text{Re}(i\sigma)}) dG = (1 - e^{-\alpha \langle l \rangle}) G, \quad (2)$$

$\alpha = 2k\chi$ – показатель поглощения.

При приближенной оценке интеграла (2) величина $\langle l \rangle$ имеет простую физическую интерпретацию – это средняя длина пути лучей, прошедших через частицу. Она оценивается из выражения

$$V = \int_G l dG = \langle l \rangle G.$$

Для взвеси n независимых частиц имеет место соотношение

$$\frac{\sum_{i=1}^n V_i}{\sum_{i=1}^n G_i} = \frac{n \langle V \rangle}{n \langle G \rangle} = \frac{\sum_{i=1}^n \langle l_i \rangle G_i}{\sum_{i=1}^n G_i} = \langle l \rangle.$$

В дальнейшем мы используем для сечения поглощения слабопреломляющих частиц формулу

$$C_{\text{abs}} = \left(1 - e^{-\alpha \frac{\langle V \rangle}{\langle G \rangle}} \right) \langle G \rangle. \quad (3)$$

Оценка (3) соответствует сечению поглощения однородного кругового цилиндра, ориентированного осью вдоль направления падающего излучения, с площадью основания $\langle G \rangle$ и высотой $\langle l \rangle = \langle V \rangle / \langle G \rangle$. В частности, для однородной сферической частицы радиуса r формула (3) принимает вид

$$C_{\text{abs}} = \left(1 - e^{-\frac{4}{3}\alpha r} \right) \pi r^2 \quad (4)$$

и совпадает с оценкой сечения поглощения, предложенной в работе [12].

В табл. 1 представлены факторы эффективности поглощения $Q_{\text{abs}} = C_{\text{abs}}/G$ сферических частиц, рассчитанные с использованием теории Ми, формул аномальной дифракции (1) и (3).

Относительная погрешность приближенных формул не превышает 10%.

В приближении аномальной дифракции показано [13], что хаотически ориентированные эллипсоидальные частицы оптически эквивалентны полидисперсным сферическим частицам и их усредненные по ориентациям и размерам сечения поглощения, а также микроструктурные параметры $\langle V \rangle$ и $\langle G \rangle$ совпадают.

Таблица 1

Факторы эффективности поглощения сферических частиц в зависимости от размера и относительного показателя преломления

kr	$m_r = n_r + i\chi$			Формула (1)	Формула (4)
	$m_r = 1 + i \cdot 0,01$	$m_r = 1,02 + i \cdot 0,01$	$m_r = 1,05 + i \cdot 0,01$	$\chi = 0,01$	$\chi = 0,01$
0,1	0,00267	0,00265	0,00262	0,00266	0,00266
1	0,0265	0,0267	0,0270	0,0263	0,0263
2	0,0523	0,0531	0,0545	0,0518	0,0519
3	0,0772	0,0791	0,0820	0,0765	0,0769
4	0,101	0,104	0,109	0,101	0,101
5	0,124	0,128	0,134	0,124	0,125
10	0,232	0,240	0,252	0,231	0,234
20	0,404	0,418	0,441	0,402	0,413
30	0,533	0,552	0,581	0,531	0,551
40	0,630	0,654	0,687	0,629	0,656
50	0,705	0,730	0,767	0,703	0,736
100	0,888	0,918	0,957	0,886	0,930
200	0,971	0,999	1,019	0,969	0,995

О корректности применения формулы (3) свидетельствуют результаты проведенных расчетов с использованием метода Т-матриц [14] и аналитического алгоритма ориентационного усреднения [13, 15] (табл. 2).

Таблица 2

Факторы эффективности поглощения для хаотически ориентированных эллипсоидальных частиц (a, b, c – полуоси частиц) с относительным показателем преломления $m_r = 1,05 + i \cdot 0,04$

($ka; kb; kc$)	Метод Т-матриц	Формула (3)
(0,1; 0,2; 0,3)	0,0162	0,0163
(1; 2; 3)	0,160	0,152
(2; 4; 6)	0,297	0,280
(3; 6; 9)	0,409	0,390
(4; 8; 12)	0,501	0,482
(5; 10; 15)	0,578	0,561
(6; 12; 18)	0,642	0,627
(7; 14; 21)	0,695	0,684
(8; 16; 24)	0,741	0,732
(9; 18; 27)	0,779	0,773
(10; 20; 30)	0,811	0,807

Для хаотически ориентированных эллипсоидальных частиц с полуосями a, b, c с погрешностью менее 1% при соотношении максимальной и минимальной полуосей менее 10^3

$$\langle G \rangle \approx \pi \left(\frac{a^p b^p + a^p c^p + b^p c^p}{3} \right)^{1/p}, \quad p = 1,6075.$$

Для хаотически ориентированных круговых цилиндров средняя длина лучей, прошедших через частицы

$$\langle l \rangle = \frac{2RL}{R+L},$$

где R, L – радиус основания и высота цилиндра соответственно.

В табл. 3 представлены факторы эффективности поглощения для вытянутых цилиндрических частиц, рассчитанные на основе метода Т-матриц, формулы (3) и алгоритма численного интегрирования [16].

Таблица 3

Факторы эффективности поглощения для хаотически ориентированных вытянутых цилиндрических частиц с относительным показателем преломления $m_r = 1,05 + i \cdot 0,04$

($kR; kL$)	Метод Т-матриц	Алгоритм [16]	Формула (3)
(0,1; 1)	0,0143	0,0144	0,0144
(1; 10)	0,142	0,132	0,135
(2; 20)	0,266	0,241	0,252
(3; 30)	0,369	0,332	0,354
(4; 40)	0,455	0,408	0,441
(6,25; 50)	0,598	0,530	0,589
(10; 100)		0,682	0,766
(10; 200)		0,714	0,782
(10; 300)		0,726	0,787
(10; 500)		0,735	0,792
(10; 1000)		0,743	0,795

Для оценки сечения поглощения хаотически ориентированных нитевидных цилиндрических частиц в работе [16] были использованы приближение аномальной дифракции (1) и численное интегрирование по ориентациям клеток; для упрощения расчетов влияние концов цилиндра не учитывалось.

Формулы [16] применимы к сильно вытянутым частицам ($L \gg R$); они не учитывают влияние границы в области оснований цилиндра, что приводит к заниженным оценкам факторов эффективности поглощения.

Результаты

При оценке спектра показателей поглощения $\alpha(\lambda)$ *Spirulina platensis* мы использовали экспериментальные данные, приведенные на рис. 1, и данные микроскопического анализа: $\langle l \rangle = 5,73$ и $1,61$ мкм соответственно для клеток до и после ультразвукового воздействия; оценка $\langle l \rangle$ точечная; объем каждой выборки превышал 100. В предположении, что хлорофилл a не теряет поглощательной способности после механического воздействия, с помощью формулы (3) были восстановлены спектры показателей поглощения взвеси клеток до и после воздействия ультразвуком (рис. 2).

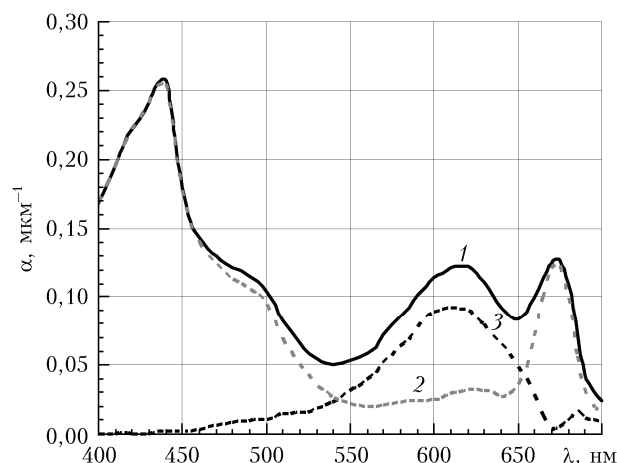


Рис. 2. Спектры показателей поглощения смеси пигментов нативных клеток (1), клеток после ультразвукового воздействия (2) и молекулярного раствора разрушенных пигментов (3)

Отдельного рассмотрения требует спектр молекулярного раствора разрушенных пигментов (рис. 2, кривая 3). При ультразвуковом воздействии были частично разрушены фикобилисомы, содержащие фикобилины (фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин). По оценкам, поглощение в максимуме ($\lambda = 611$ нм) фикоцианина уменьшилось на 80%. Локальный максимум ($\lambda = 680$ нм), по-видимому, соответствует димеру хлорофилла a , который является сильным биологическим окислителем.

На рис. 3 представлены спектры удельных коэффициентов поглощения $C_{abs}(\lambda)/\langle V \rangle$ в зависимости от микроструктурного параметра $\langle l \rangle$ ($\langle l \rangle = 0$

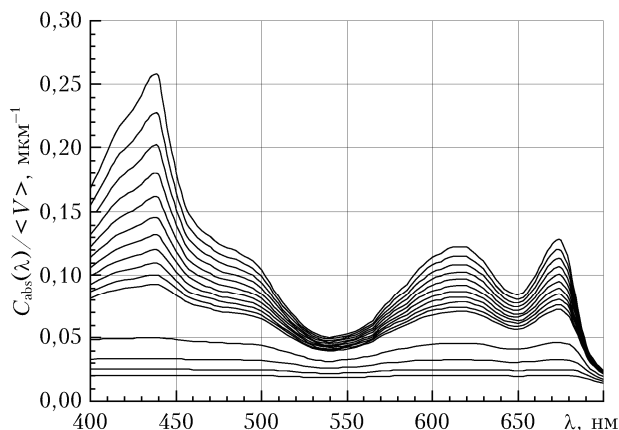


Рис. 3. Спектр нормированных сечений поглощения в зависимости от параметра $\langle l \rangle = 0$ (1), 10 (10), 50 мкм (в скобках указана величина шага между соседними значениями параметра)

соответствует молекулярному раствору пигментов, а значения удельного коэффициента поглощения равны $\alpha(\lambda)$ (табл. 4)). Эти зависимости характеризуют эффективность и вариации поглощения при неизменной концентрации пигментов в клетке. Необходимо отметить, что удельный коэффициент поглощения $C_{\text{abs}}(\lambda)/\langle V \rangle$ при фиксированной λ является монотонно убывающей функцией $\langle l \rangle$.

С физической точки зрения сечение поглощения взвеси клеток – это мощность поглощенной энергии, нормированная на интенсивность падающего излучения. Знание динамики и спектрального состава падающего излучения позволяет, основываясь на данных, представленных на рис. 3, оценить энергию, поглощенную взвесью клеток *Spirulina platensis* в области фотосинтетически активной радиации.

Оценки показателей поглощения пигментов *Spirulina platensis* (табл. 4) подобны данным, полу-

Таблица 4

Спектр показателей поглощения $\alpha(\lambda)$ для *Spirulina platensis*

λ , нм	$\alpha(\lambda)$, МКМ ⁻¹	λ , нм	$\alpha(\lambda)$, МКМ ⁻¹	λ , нм	$\alpha(\lambda)$, МКМ ⁻¹
400	0,167	500	0,104	600	0,114
405	0,182	505	0,094	605	0,117
410	0,197	510	0,083	610	0,121
415	0,212	515	0,074	615	0,122
420	0,222	520	0,066	620	0,122
425	0,230	525	0,059	625	0,117
430	0,241	530	0,054	630	0,111
435	0,255	535	0,051	635	0,101
440	0,257	540	0,050	640	0,092
445	0,216	545	0,051	645	0,086
450	0,180	550	0,053	650	0,084
455	0,155	555	0,055	655	0,089
460	0,143	560	0,059	660	0,099
465	0,135	565	0,063	665	0,113
470	0,130	570	0,072	670	0,123
475	0,124	575	0,079	675	0,127
480	0,121	580	0,086	680	0,109
485	0,119	585	0,092	685	0,073
490	0,115	590	0,101	690	0,044
495	0,111	595	0,108	695	0,031

ченным на основе поглощения экстрактов пигментов сине-зеленых водорослей [6], и превышают их на 25–30%.

Обсуждение и выводы

Предложенный способ определения показателей поглощения пигментов наиболее эффективен для клеток фитопланктона. Он позволяет в ряде случаев исключить погрешности, связанные с экстрагированием пигментов – спектры поглощения экстрактов пигментов не соответствуют истинным спектрам поглощения, так как при экстрагировании происходит частичная деструкция пигментов и изменяются положения локальных максимумов поглощения [6]. Для корректного определения спектра показателей поглощения пигментов по измеренному спектру поглощения взвеси нативных клеток необходимо знать 1) микроструктурный параметр $\langle l \rangle$ (рис. 4) и 2) одну «реперную» точку – показатель поглощения, например, при $\lambda = 675$ нм. В этом случае искомым результатом получается с использованием формулы (3).

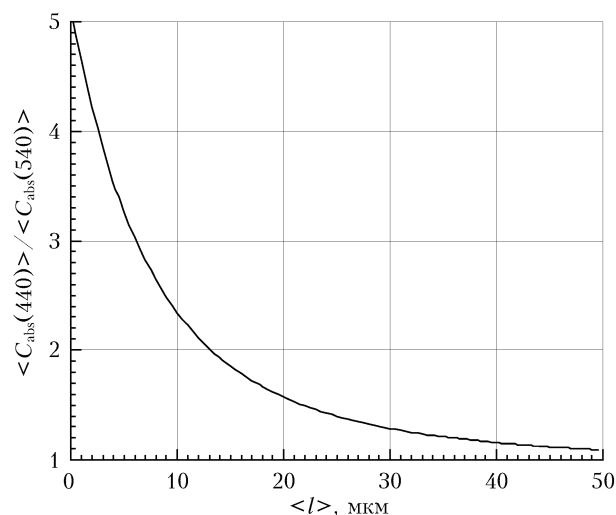


Рис. 4. Отношение $\langle C_{\text{abs}}(440) \rangle / \langle C_{\text{abs}}(540) \rangle$ в зависимости от $\langle l \rangle$

Одним из возможных приложений полученных результатов является определение внутриклеточной концентрации пигментов. Для этого используем разложение спектра показателей поглощения $\alpha(\lambda)$ (рис. 5) на гауссианы [5, 8]:

$$\alpha(\lambda) = \sum_{i=1}^{13} C_i a_i^*(\lambda_i) e^{-\frac{(\lambda - \lambda_i)^2}{2\sigma_i^2}},$$

C_i – внутриклеточная концентрация пигментов, мг · м⁻³; $a_i^*(\lambda_i)$ – удельный показатель поглощения пигментов, м² · мг⁻¹, в локальных максимумах поглощения λ_i хлорофилла a ($\lambda_i = 384; 415; 436; 623; 675; 700$ нм), каротиноидов ($\lambda_i = 464; 493; 532$ нм), фикоэритрина ($\lambda_i = 498; 565$ нм), фикоцианина ($\lambda_i = 611$ нм), аллофикоцианина ($\lambda_i = 658$ нм); σ_i характеризует полуширину распределения.

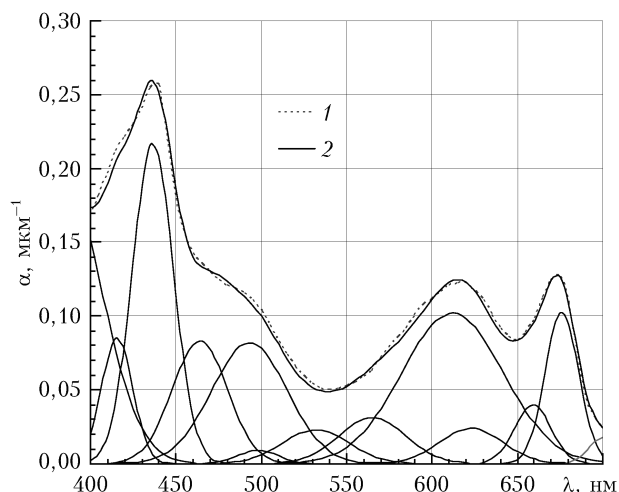


Рис. 5. Спектр показателей поглощения $\alpha(\lambda)$ *Spirulina platensis* (1) и его разложение в виде линейной комбинации гауссианов (2)

Известно [5, 8, 9]: $a_i^*(675) = 0,02$; $a_i^*(611) = 0,007$; $a_i^*(565) = 0,01$. Используя эти данные и результаты разложения (рис. 5), можно определить внутриклеточную концентрацию хлорофилла $a - 5,15 \cdot 10^6 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-3}$, фикоцианина — $14,6 \cdot 10^6 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-3}$, фикоэритрина — $3,1 \cdot 10^6 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-3}$. Значение $a_i^*(675) = 0,02$ согласуется с результатами других авторов, в то время как информации для фикобилинов очень мало [9]. Недооценка $a_i^*(\lambda_i)$ может привести к переоценке C_i и наоборот.

Отметим, что формула (3) практически снимает неопределенность в распределении биологических клеток по форме и размеру. В ряде случаев анализ и моделирование поглощения фитопланктона могут быть сведены к простым инженерным расчетам, в том числе при выборе оптимального режима освещения для культивирования водорослей.

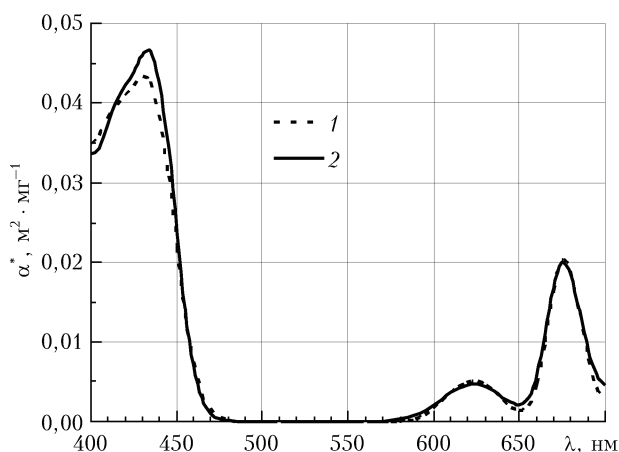


Рис. 6. Спектры удельных показателей поглощения молекулярного раствора хлорофилла a : данные [8], усредненные по трем группам водорослей (1), результаты настоящего исследования (2)

Очень важен вопрос о достоверности результатов, полученных на основании двух измерений (см. рис. 1) и данных микроскопического анализа. Для

ответа на этот вопрос спектры поглощения хлорофилла a [8], усредненные по трем группам водорослей: диатомовые (*Diatom*), зеленые (*Chlorophyceae*) и примнезиофициевые (*Prymnesiophyceae*), сравнивались с нашими результатами для цианобактерии *Spirulina platensis* (рис. 6). Спектральные зависимости, представленные на рис. 6, соответствуют удельным показателям поглощения $\alpha^*(\lambda)$ хлорофилла a с концентрацией $C = 1 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-3}$.

Исходя из химических и физических представлений, спектр поглощения молекулярного раствора хлорофилла a единичной концентрации является инвариантом и не зависит от группы водорослей. Согласование результатов настоящей работы с литературными данными для различных групп водорослей свидетельствует о корректности результатов, полученных независимо, различными способами и для различных объектов исследования.

Заключение

Результаты настоящей работы могут быть полезны при разработке и развитии методов биооптической дистанционной диагностики цианобактерий в природных водах по данным оптических сенсоров орбитальных спутников и по результатам натурных экспериментов с использованием методов флуориметрии [17].

Знание показателей поглощения пигментов в видимой области спектра можно использовать для оценки концентрации (биомассы) монокультуры водорослей, а также для исследования изменения внутриклеточной концентрации пигментов водорослей в зависимости от внешних условий (света, питания) и физиологического состояния клеток.

1. Morel A. Light and marine photosynthesis: A spectral model with geochemical and climatological implications // Prog. Oceanogr. 1991. V. 26. P. 263–306.
2. Platt T., Sathyendranath S. Oceanic primary production: Estimation by remote sensing at local and regional scales // Science. 1988. V. 241. P. 1613–1620.
3. Bricaud A., Morel A., Babin M., Allali K., Claustre H. Variations of light absorption by suspended particles with chlorophyll a concentration in oceanic (case 1) waters: Analysis and implications for bio-optical models // J. Geophys. Res. 1998. V. 103. P. 31033–31044.
4. Sathyendranath S., Cota G., Stuart V., Maass H., Platt T. Remote sensing of phytoplankton pigments: A comparison of empirical and theoretical approaches // Int. J. Remote Sens. 2001. V. 22. P. 249–273.
5. Ficek D., Kaczmarek S., Ston-Egiert J., Wozniak B., Majchrowski R., Dera J. Spectra of light absorption by phytoplankton pigments in the Baltic: Conclusions to be drawn from a Gaussian analysis of empirical data // Oceanologia. 2004. V. 46. P. 533–555.
6. Kirk J.T.O. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. 3rd ed. Cambridge: University Press, 2011. 649 p.
7. Duysens L.M.N. The flattening effect of the absorption spectra of suspensions as compared to that of solutions // Biochim. Biophys. Acta. 1956. V. 19. P. 1–12.
8. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1991. V. 73. P. 11–23.
9. Simis S.G.H., Kauko H.M. In vivo mass-specific absorption spectra of phycobilipigments through selective

- bleaching // *Limnol. Oceanogr.: Methods*. 2012. V. 10. P. 214–226.
10. *Парамонов Л.Е., Хромечек Е.Б., Абдулкин В.В., Шмидт В.А.* К решению обратных задач на классах эквивалентности // *Оптика атмосф. и океана*. 2004. Т. 17, № 5–6. С. 508–512.
 11. *Ван де Хюлст Г.* Рассеяние света малыми частицами / пер. с англ. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1961. 536 с.
 12. *Шифрин К.С., Тонна Г.* Простая формула для коэффициента поглощения слабопреломляющих частиц // *Оптика и спектроскопия*. 1992. Т. 72. С. 487–490.
 13. *Парамонов Л.Е.* Оптическая эквивалентность изотропных ансамблей эллипсоидальных частиц в приближениях Рэлея–Ганса–Дебая и аномальной дифракции, и ее следствия // *Оптика и спектроскопия*. 2012. Т. 112, № 5. С. 853–861.
 14. *Waterman P.C.* Symmetry, unitarity and geometry in electromagnetic scattering // *Phys. Rev. D*. 1970. V. 3. P. 825–839.
 15. *Paramonov L.E.* T-matrix approach and the angular momentum theory in light-scattering problems by ensembles of arbitrarily shaped particles // *J. Opt. Soc. Am. A*. 1995. V. 12. P. 2698–2707.
 16. *Kirk J.T.O.* A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. III. Cylindrical and spheroidal cells // *New Phytol.* 1976. V. 77, N 2. P. 341–358.
 17. *Кузьминов Ф.И., Ширшин Е.А., Горбунов М.Ю., Фадеев В.В.* Новые оптические подходы в исследовании фотофизиологических характеристик цианобактерий *in situ* // *Фундам. и прикл. гидрофиз.* 2015. Т. 8. С. 41–47.

L.E. Paramonov. Spectrum of absorption coefficients and intracellular concentration of cyanobacterial pigments by the example of *Spirulina platensis*.

An analytical estimate of the absorption cross section for homogeneous nonspherical particles and their suspensions is suggested and justified. On the example of *Spirulina platensis*, a method for evaluating the spectrum of pigment absorption for photosynthetically active radiation, excluding the use of pigment extracts, is considered. The effect of the size and shape distribution of cells on the absorption spectra is studied. The intracellular concentrations of chlorophyll *a*, phycoerythrin, and phycocyanin are estimated.