

Дж. М. Джавршян, Г. А. Айрапетян
НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ СПЕКТРОФОТО-
МЕТРИИ ХЛОРЕЛЛЫ^x

В последнее время одноклеточная водоросль хлорелла все чаще привлекает внимание исследователей. Она оказалась прекрасным объектом для решения многих вопросов в биофизической спектроскопии (1, 5 и др.).

Известно, что фотосинтезирующие объекты являются оптически очень гетерогенными структурами и для них характерны эффекты "проскока", рассеивания и другие явления геометрической оптики, которые в конечном счете приводят к искажению истинных спектров поглощения пигментов и других молекул *in vivo*.

С этой точки зрения изучение влияния вышеуказанных эффектов на спектры поглощения суспензии хлореллы представляет большой интерес. Подобный подход способствует выявлению истинных спектров поглощения пигментов фотосинтетического аппарата в различных условиях функционирования.

Целью настоящей работы является выяснение влияния явления "проскока" и рассеяния на спектральные свойства суспензии хлореллы в зависимости от различных экспериментальных условий измерения.

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследования служила *Chlorella pyrenoidosa* - 82, выращенная на среде Тамия и любезно представленная нам Институтом агрохимических проблем и гидропоники АН Арм. ССР. В дальнейшем мы хлореллу выращивали на среде Тамия на новой установке - культиваторе, собранном Д. М. Джавршяном.

Эта установка позволяет поддерживать постоянное освещение, поток смеси газов (воздуха и двуокиси углерода). Блок-схема культиватора изображена на рис. 1.

Исследования спектров поглощения производились на саморегистрирующем спектрофотометре СФ-10. Спектры поглощения снимались в плоских прямоугольных кюветах, а некоторые спектры сняты в прямоугольных дискообразных самодельных кюветах, толщиной слоя в 4 мм, что позволило в тех же кюветах регистрировать спектры поглощения и отражения того же образца.

^x Работа выполнена в Ереванском государственном университете.

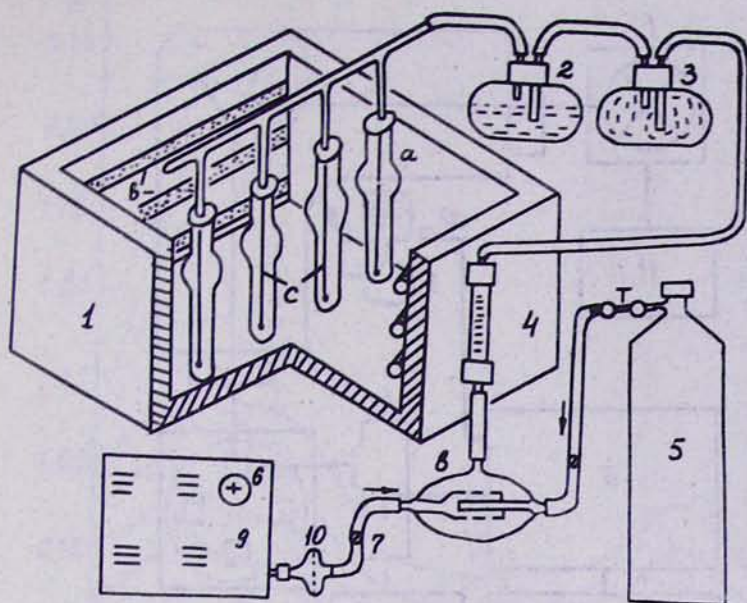


Рис. 1. Блок-схема стационарной установки для интенсивного выращивания одноклеточной водоросли: 1 - Блок для освещения и барботаж хлореллы: а - сосуды для культивирования водорослей, б - лампы дневного света, в - барботеры; 2 - увлажнитель; 3 - стерильный влажный фильтр; 4 - ротометр; 5 - баллон с углекислым газом; 6 - манометры; 7 - краны; 8 - смеситель воздуха и углекислого газа; 9 - установка компрессорная УК-40/2.

Спектры рассеивания измерялись как на реконструированном СФ-10 (6,7), так и на установке, собранной Д. Джавршианом, блок-схема которой приведена на рис. 2.

Микроскопический контроль объектов производился с помощью светового микроскопа МБИ-6. Определение концентрации суспензии производилось с помощью камеры Горяева.

Результаты исследования

Для спектроскопии светорассеивающих сред большой интерес представляют такие экспериментальные факторы, как концентрация суспензии, размеры ее частиц, толщина поглощающего слоя, характер распределения светопоглощающих молекул и др.

Зависимость спектров поглощения хлореллы от концентрации клеток изучалась на восьмидневной культуре, выращенной на вышеуказанной установке, для чего культура разводилась в среде Тамия до желаемой концентрации и регистрировались спектры. Параллельно определялась концентрация клеток суспензии.

Известно, что спектр поглощения хлореллы в видимой части спектра обусловлен в основном светопоглощением молекул пигментов.

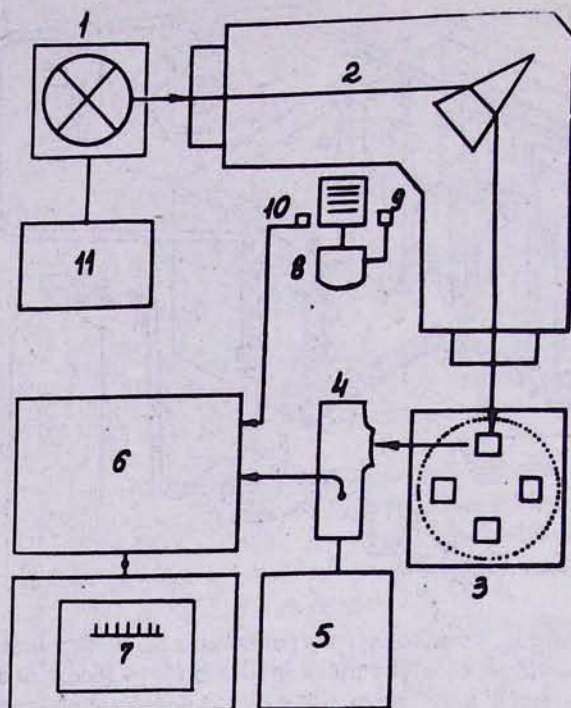


Рис. 2. Блок-схема установки для получения спектров рассеяния: 1—источник света (лампа накаливания 12В); 2—монохроматор УМ-2; 3—камера для образца; 4—фотоумножитель; 5—блок, питающий фотоумножитель; 6—усилитель; 7—самописец КСП-4; 8—двигатель, вращающий барабан со шкалой длин волн; 9—устройство для автоматической остановки вращения барабана; 10—устройство для автоматического нанесения реперных линий на диаграммной ленте; 11—стабилизатор, питающий лампу накаливания.

Для спектра поглощения хлореллы характерны две полосы поглощения в красной и синей частях спектра. Красный максимум часто имеет два компонента поглощения, что обусловлено различными формами пигментов. Спектру поглощения хлореллы тоже свойственны большие оптические плотности в зеленой и дальней красной областях спектра, хотя пигменты хлореллы обладают незначительной поглощательной способностью в этих областях. Это говорит о том, что вид измеряемого спектра поглощения значительно обусловлен также другими явлениями оптики. Неслучайно, что спектр поглощения спиртового раствора смесей пигментов (рис. 3, кр. 1¹—4¹) сильно отличается от спектра поглощения суспензии хлореллы (рис. 3, кр. 1—4) той же концентрации.

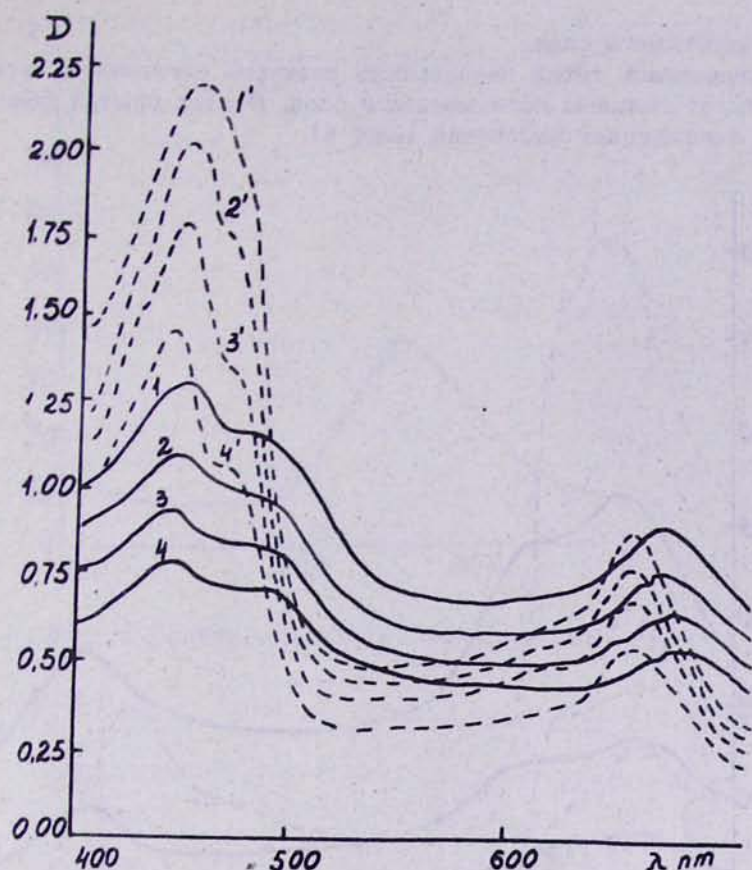


Рис. 3 Спектры поглощения суспензии хлореллы (1-4) и вытяжек пигментов в метиловом спирте (1'-4'): 1 и 1' - $14,33 \cdot 10^5$ кл (см³); 2 и 2' - $12,53 \cdot 10^5$ кл/см³; 3 и 3' - $10,74 \cdot 10^5$ кл/см³; 4 и 4' - $8,95 \cdot 10^5$ кл/см³.

Для получения пигментов одинаковой концентрации такое же количество суспензии хлореллы осаждалось с помощью центрифугирования и клетки были измельчены в таком же объеме метилового спирта. Нетрудно заметить, что при размельчении в метиловом спирте происходит сдвиг красного максимума в сторону коротких длин волн.

Аналогичный сдвиг происходит в "синем" максимуме, хотя на спектрограмме при регистрации спектров максимум смещается в сторону длинных волн, что связано с аппаратным искажением (8). Согласно литературным данным, эти коротковолновые смещения происходят за счет изменения нативного состояния пигментов.

Другой особенностью спектра поглощения спиртовой вытяжки разрушенных клеток является то, что оптическая плотность в коротковолновой полосе поглощения выше, чем у суспензии целых клеток, а в области от 500 до 750 нм наблюдается ее падение. Эта закономерность сохраняется при различных концентрациях и различных толщи-

нах поглощающего слоя.

Исследовалась также зависимость спектров поглощения суспензии хлореллы от толщины поглощающего слоя. В этих опытах обнаруживаются аналогичные изменения (рис. 4).

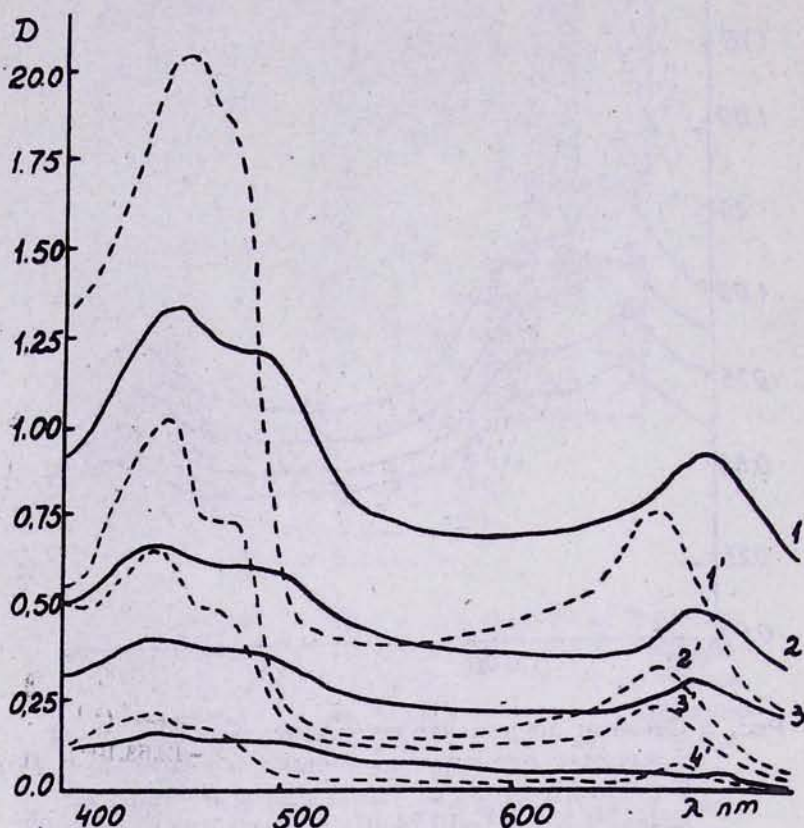


Рис. 4. Спектры поглощения суспензии хлореллы (1-4) и вытяжек пигментов (1'-4') в зависимости от толщины поглощающего слоя: 1 и 1' - 10 мм; 2 и 2' - 5 мм; 3 и 3' - 3 мм; 4 и 4' - 1 мм.

Надо отметить, что с увеличением концентрации и толщины поглощающего слоя оптическая плотность увеличивается также в зеленой и далекой красной областях спектра.

С целью установления природы этих спектральных изменений нами изучалась зависимость спектров отражения и рассеивания от концентрации. Из рис. 5 видно, что суспензия хлореллы обладает свойством селективного отражения света. Более высоким коэффициентом отражения характеризуется далекая красная часть спектра. Минимум отражения проявляется в области 400-520 нм.

Изучение спектров светорассеивания суспензии хлореллы показало такой же селективный характер (рис. 6). Большим коэффициентом рассеивания обладает далекая красная, а затем зеленая части спектра.

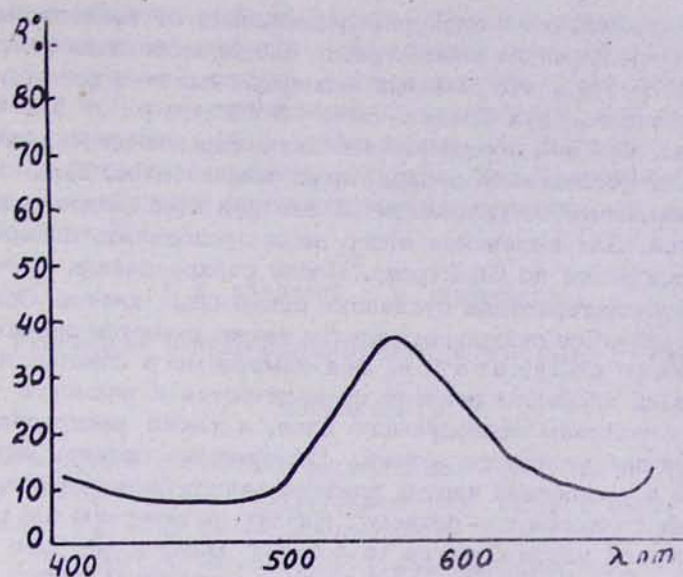


Рис. 5 Спектр отражения суспензии хлореллы.

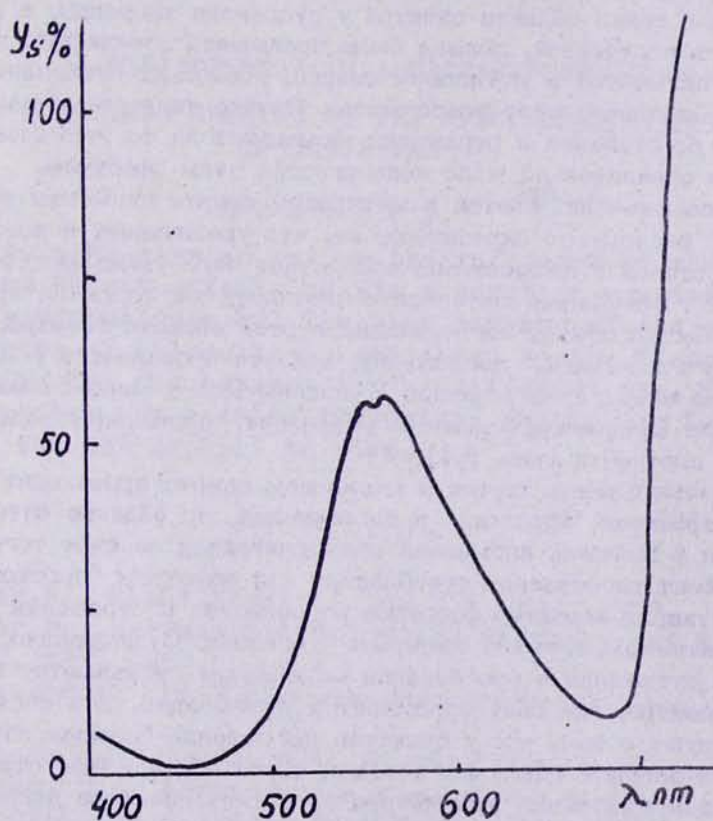


Рис. 6 Спектр рассеивания суспензии хлореллы.

Исследования зависимости спектров рассеивания от концентрации показали, что с увеличением концентрации светорассеивание увеличивается. Важно отметить, что зеленый максимум спектра рассеивания хлореллы состоит из двух компонентов: λ 566 нм и λ 575 нм. Было показано, что это соответствует двум формам пигментов (9).

Далее, нами исследована природа этих компонентов. Была поставлена задача выяснить, обусловлены ли эти два компонента одной и той же клеткой. Для выяснения этого нами проводилась синхронизация культур хлореллы по Спектротру. После синхронизации изучались спектральные характеристики суспензии синхронных клеток. Опыты показали, что у спектров синхронных клеток также имеются оба компонента.

Обсуждение результатов. Вид измеряемого спектра поглощения суспензии хлореллы зависит от количества и размеров частиц в суспензии и толщины исследуемого слоя, а также распределения светопоглощающих молекул в кювете. Измеряемые спектры поглощения хлореллы в различных частях спектра могут быть искажены под влиянием этих факторов по-разному. Низкую оптическую плотность в коротковолновой части спектра (в "синем" максимуме) для суспензии по сравнению с раствором пигментов в метиловом спирте можно объяснить эффектом "проскока", который сильнее влияет на величину оптической плотности в этой части спектра. По существу, оптическая плотность в синей области спектра у суспензии хлореллы, в противоположность полученной, должна была превышать оптическую плотность раствора пигментов в метиловом спирте, поскольку суспензия хлореллы также вызывает светорассеивание. Однако полученные данные по спектрам рассеивания и отражения указывают на то, что отмеченный максимум сравнительно мало подвергается этим эффектам.

При размельчении клеток в метиловом спирте пигменты выходят в среду и равномерно окрашивают ее, что увеличивает вероятность встречи фотонов с пигментами, вследствие чего уменьшается эффект "проскока". Повышения оптической плотности могло бы не произойти, если бы пигменты, поглощающие в этой области спектра, не имели большого показателя поглощения, как это проявляется у красного максимума спектра поглощения. У максимумов с малым показателем поглощения (например, "красный" максимум) происходит падение оптической плотности (рис. 3,4).

При размельчении клеток в метиловом спирте происходит исчезновение эффектов "проскока" и рассеивания. Но падение оптической плотности у вытяжки пигментов обнаруживается за счет того, что здесь эффект рассеивания преобладает над эффектом "проскока".

Селективный характер спектров рассеивания и отражения обусловлен селективным светопоглощением суспензии. Существенно, что в спектрах отражения и рассеивания максимумы проявляются в тех областях спектра, где свет поглощается минимально. Эти спектры свидетельствуют о том, что у спектров поглощения большие оптические плотности далекой красной и зеленой части обусловлены отражением и рассеиванием света. Однако при сравнении спектров поглощения и рассеивания полного соответствия не обнаруживается, т.е. светорассеивание не является результатом полного количественного выраже-

ния фильтрации света при поглощении. Об этом свидетельствует проявление компонентов в спектре рассеивания в зеленом максимуме, которое отсутствует в спектре поглощения при таких же длинах волн.

Рабинович и Латимер высказали предположение, что селективность спектров рассеивания можно использовать для изучения состояния пигментов в фотосинтетическом аппарате. Это было доказано нами исследованием спектров светорассеивания хлореллы под углом в девяносто градусов (9).

Ջ. Լ. ՀԱՎՈՇՅԱՆ, Հ. Ա. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՔԼՈՐԵԼԱՅԻ ՍՊԵԿՏՐՈՖՈՏՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ԼՐԻ ՔԱՆԻ ՀԱՐՑԵՐ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է *Chlorella pyrenoidosa* 82-ի կլանման սպեկտրի վրա ցրման և «թռիչքի» էֆեկտների ազդեցությունը: Ցույց է տրվել, որ քլորելայի կլանման սպեկտրի կապույտ մաքսիմումը առավել ենթակա է «թռիչքի» էֆեկտին, իսկ «կարմիր» մաքսիմումը՝ ցրման էֆեկտին: Ցույց է տրված նաև, որ ցրման սպեկտրը ունի բնորոշական բնույթ և այն կարելի է օգտագործել բլոբոֆիլի վիճակը in vivo ուսումնասիրելու համար:

J.M.DJAVRSHYAN, H.A.HAIRAPETYAN

SOME QUESTIONS RELATED TO THE SPECTROPHOTOMETRY OF CHLORELLA

S u m m a r y

Studies were carried out on the influence of the diffusion and "leap" effects on the absorption spectre of *Chlorella pyrenoidosa* 82. The blue maximum of the absorption spectre of *Chlorella* is subjected to the "leap" effect, while the red maximum to the diffusion one. The diffusion spectre has a selective nature and it may be used to study the chlorophyll in vivo.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Latimer P., Plant Physiol., 34, N 3, 193, 1959.
2. Latimer P., Rabinowitch E., Arch. Biochem. and Biophys., 84, N2, 428, 1959.
3. Рабинович Е. "Тр. У Междунар. биохим. конгр.", симп. V1, 1962.
4. Сидько Ф.Я., Терсков И.А., Ерошин Н.С., Немченко И.А., Захарова В.А., Теоретические и прикладные проблемы рассеивания света, Минск, изд-во "Наука и техника", 1971.
5. Брандт А.Б., Тагеева С.В. Оптические параметры растительных организмов, М., изд-во "Наука", 1967.

6. Джавршян Дж. М. "Молекулярная биофизика". Тезисы Всесоюз. конф. молодых ученых. Пятино. 1968_
7. Джавршян Дж. М. "Материалы научной конференции молодых ученых", изд-во ЕРГУ, 1971.
8. Джавршян Дж. М. Молодой научный работник, изд-во ЕРГУ, 2 (12), 1970.
9. Джавршян Дж. М. Вторая научная сессия по вопросам молекулярной биологии и биофизики (тезисы докладов), Ереван, 1970.