

# БИОФИЗИКА ФОТОСИНТЕЗА И МЕТОДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

*А. Б. Рубин*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва*

Фотосинтез является ключевым звеном сложной системы метаболизма, обеспечивающей в итоге рост и развитие растений и одноклеточных водорослей в соответствии с генетической программой. В фотосинтезе происходит преобразование энергии света в энергию химических связей продуктов фотосинтеза.

Результаты биофизических исследований фотосинтеза создают научную основу методов автоматического управления ростом фотосинтезирующих микроорганизмов в фотобиотехнологии и методов экспресс-диагностики состояния клеток фитопланктона в экологическом мониторинге водных биоценозов.

Хорошо известно, что в водных экосистемах начальным и ключевым звеном трофической цепи являются фитопланктонные одноклеточные микроорганизмы, продуктивность и обилие которых в тех или иных условиях определяется в основном эффективностью процессов фотосинтеза.

При разных световых освещенностях, температурах и действии внешних факторов (загрязнений), в том числе и стрессового характера, изменяется состояние фотосинтетического аппарата, продуктивность фотосинтеза и число клеток фитопланктона и тем самым продуктивность всей водной экосистемы. Источником необходимой информации служит хлорофилл, локализованный в фотосинтетических мембранах, обладающий определенными спектральными свойствами, изменение которых при разных воздействиях можно регистрировать в режиме реального времени. Именно это и дает необходимую информацию для экспресс-диагностики состояния клеток.

В настоящей статье представлены результаты, полученные сотрудниками кафедры биофизики Биологического факультета МГУ по биофизическим механизмам первичных процессов фотосинтеза (ППФ) и разработанные на этой основе люминесцентные методы экспресс-диагностики состояния клеток фитопланктона для экологического мониторинга водных биоценозов и биоиндикации состояния водной среды.

## **Общая характеристика ППФ**

Энергетическую основу фотосинтеза составляет система первичных процессов фотосинтеза (ППФ), где происходит непосредственное запаса-

ние энергии света в виде химических связей конечного восстановленного продукта световой стадии NADP, а также АТФ, сопряженного с генерацией трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода – движущей силы синтеза АТФ.

Во многом именно в ходе исследований ППФ в биофизике сформировались современные фундаментальные представления об электронно-конформационных взаимодействиях как основе молекулярных механизмов функционирования биомолекул и трансформации энергии в биомембранах, различных уровнях динамической регуляции переноса электрона в макромолекулярных комплексах, сопряженных с подвижными переносчиками [16,17,31].

Вся совокупность ППФ, протекающих в фотосинтетических мембранах, осуществляется с участием пяти белковых и пигмент-белковых комплексов (ПБК), встроенных в мембрану тилакоида, три из которых (фотосистемы ФС1, ФС2 и цитохромный *b<sub>6</sub>/f* комплекс) взаимодействуют с подвижными переносчиками (пластохиноны, пластоцианин, ферридоксин  $\Phi_d$ ), генерируя поток электронов от воды до NADP<sup>+</sup>.

Общая организация электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) показана на рис. 1. Главная особенность ППФ состоит в том, что начальные этапы переноса электрона и восстановление первичного акцептора происходят в РЦ очень быстро, за несколько пикосекунд ( $2 \cdot 10^{-12}$  с). Это обстоятельство обуславливает почти 100% эффективность начального разделения зарядов в фотосинтезе, поскольку оно происходит намного быстрее, чем испускание света флуоресценции отдельными возбужденными молекулами хлорофилла в растворе ( $5 \cdot 10^{-9}$  с).

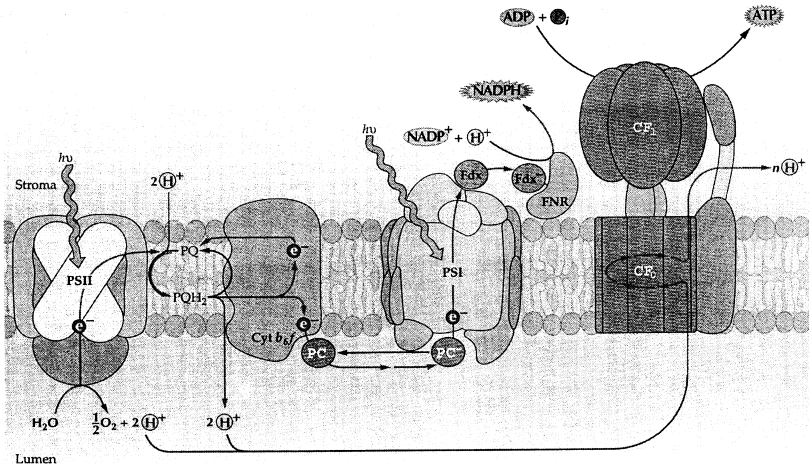


Рис.1. Электрон-транспортная цепь фотосинтеза в мембране тилакоида

Общее время переноса электрона и появление конечных продуктов световой стадии (NADPH и АТФ) составляет  $\sim 10^{-1} - 10^{-2}$  с, что сопоставимо со временами обычных ферментативных процессов. Однако за этот период времени электрон переносится на большие межмолекулярные расстояния через мембрану с участием нескольких крупных подвижных макромолекулярных комплексов (РЦ, цит  $b_6/b_5$ ), которые закреплены в вязкой мембране.

Ясно, что такая целостная система ППФ, обладающая структурно-функциональной автономией и сложной организацией, должна характеризоваться своеобразными механизмами переноса электрона и динамическими способами саморегуляции своего состояния.

### **Особенности регуляции системы ППФ**

Под регуляцией можно понимать направленную перестройку сложной системы с сохранением ее интегральной целостности с целью обеспечения оптимального функционирования при изменении внешних и внутренних условий. Механизмы регуляции условно можно разделить на «медленные» и «быстрые». В физиологии фотосинтеза «медленные» предполагают перестройку и изменение структуры хлоропласта и его компонентов, связанную с включением генетического аппарата и синтезом новых белков. Механизмы «быстрой» регуляции ответственны за динамические изменения в функционировании отдельных участков фотосинтетической цепи и с синтезом белка не связаны. Они основаны на изменениях констант взаимодействия переносчиков, например, вследствие изменения их конформации.

Важную роль в регуляции редокс-состояния переносчиков ЭТЦ играет пул хинонов. Именно на этом этапе замедляется скорость потока электронов при образовании трансмембранной разности электрохимических потенциалов, т.е. осуществляется контроль скорости линейного транспорта электронов со стороны сопрягающего механизма [8]. От восстановленности хинонов, в свою очередь, зависит редокс-состояние переносчиков цепи между ФС. В настоящее время наиболее хорошо изучен механизм быстрой регуляции переноса электрона за счет перераспределения энергии возбуждения между двумя ФС, основанный на обратимом фосфорилировании белков светособирающего комплекса (ССК) (рис. 2) [9]. Дополнительный отрицательный заряд, получаемый основным полипептидом ССК при присоединении фосфатной группы специальной киназой, вызывает его латеральную миграцию к ФС I и увеличивается вклад циклического фосфорилирования. В активировании киназы огромную роль играет редокс-состояние переносчиков электронов. Каталитическая часть киназы локализована в строме хлоропласта, а ее мембранная

часть связана с цитохромным комплексом. Киназа не активна, пока пул хинонов окислен. После посадки дважды восстановленного хинона на цитохромный комплекс он восстанавливает железо-серный комплекс Риске и цитохром *f*, вызывая одновременно конформационные изменения в макромолекуле цитохромного комплекса вблизи внутренней поверхности мембраны, передающиеся на мембранную часть киназы. Изменения ее конформации активирует фермент, который фосфорилирует треониновые остатки на белках ССК и ФС 2 [74]. Изменение активности фосфатазы также зависит от конформационных перестроек на внутренней поверхности цитохромного комплекса. Пока цитохромный комплекс восстановлен, фосфатаза «заблокирована», после его окисления фосфатаза активируется и дефосфорилирует фосфорилированные белки, в том числе и ССК. Потеряв дополнительный заряд, белок транспортируемого ССК диффундирует обратно и вновь ассоциируется с ФС 2, увеличивая ее светопоглощение (сечение поглощения).

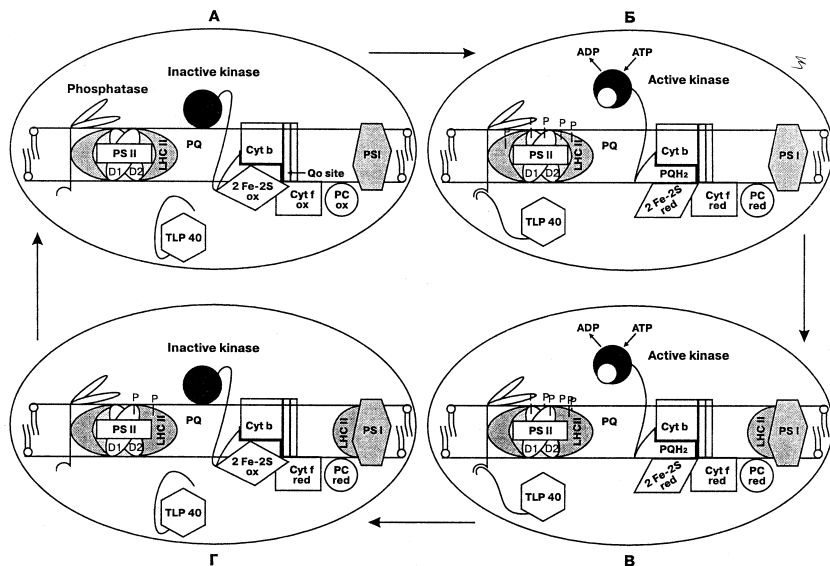


Рис. 2. Изменение распределения поглощенных квантов между ФС с помощью механизма обратимого фосфорилирования белков тилакоида [74]

Таким образом происходит «подстройка» ЭТЦ, обеспечивающая оптимальное соотношение циклического и нециклического потока электронов и защиту ФС 2 от фотоокисления [20]. Появление отрицательного заряда при фосфорилировании полипептидов ФС 2 может иметь и другие последствия. Так, оно может ослабляет связь  $Q_A$  с белком, приводя к по-

тере  $Q_A$  и тем самым прерывать линейный электронный транспорт (Рубин, Чемерис, неопубликованные данные). Ниже мы обобщим значение процессов такого рода.

Важную роль в обеспечении эффективной работы ЭТЦ и поддержании оптимальных для каждой конкретной ситуации редокс-состояний участников электрон-транспортных процессов играет также и Фд. Он является ключевым компонентом альтернативных метаболических путей, связанных с восстановлением разных акцепторов ФС I. Фд, восстановленный в результате работы ЭТЦ, помимо ФНР, служит донором электронов для сульфитредуктазы, ферментов пути ассимиляции азота в хлоропласте – нитритредуктазы, ГОГАТ, а также молекулярного кислорода и тиоредоксинредуктазы. Наличие большого числа терминальных акцепторов открывает дополнительные возможности для регуляции электронного потока и систем ассимиляции  $CO_2$  и азота, что необходимо для обеспечения процессов синтеза белка в хлоропласте. Кроме того, существование альтернативных путей сброса электронов препятствует «перевосстановлению» компонентов, поддерживая их в определенном редокс-состоянии [44].

На первый взгляд кажется, что регуляция состояния ЭТЦ с помощью рассматриваемых механизмов направлена на повышение эффективности использования поглощенной энергии света в хлоропласте. Действительно, эффективность процессов разделения зарядов в РЦ фотосинтеза близка к 100%, однако в стабильных продуктах фотосинтеза эффективность запасаения энергии значительно меньше. С другой стороны, известно, что активные формы кислорода вызывают переокисление липидов в мембранах и являются причиной окислительного стресса в клетках. В основе этого явления лежит целый ряд химических превращений с участием активных радикалов. Большая роль здесь принадлежит активации кислорода за счет избытка непотребленной с ППФ энергии электронного возбуждения хлорофилла с образованием синглетного кислорода [16, 17]. Из результатов исследований последних лет, в том числе и наших, стало ясно, что развитие окислительного стресса фотосинтетического аппарата, которое зависит от образования активных форм  $O_2$ , определяется избытком электронов и энергии электронного возбуждения в цепи. Можно предполагать, что именно наличие гибкой системы регуляции предотвращает развитие окислительных повреждений за счет создания оптимального состояния ЭТЦ, при котором нет избытка или недостатка электронов или энергии возбуждения как источников образования активных форм  $O_2$ .

### **Механизмы транспорта электронов**

В многокомпонентных макромолекулярных комплексах, содержащих РЦ, в основе высокоэффективного направленного транспорта элект-

тронов лежит туннелирование электрона, сопряженное с колебательными и конформационными изменениями в белковой матрице. РЦ фотосинтеза представляет собой фактически фотоактивный фермент, субстратом которого является свет. Увеличение прочности и числа водородных связей влияет на скорость релаксационных процессов в белках РЦ и сопряженно с ними переноса электронов из-за снижения внутримолекулярной подвижности белковой матрицы по выделенным колебательным степеням свободы и участия «неотрелаксированных» состояний переносчиков. Для изучения природы релаксационных процессов в высокоупорядоченном комплексе переносчиков используются воздействия, модифицирующие систему водородных связей (криопротекторы, изотопное замещение  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$ , многоатомные спирты, апротонные растворители). Эти воздействия, делая водородные связи менее лабильными, замедляют релаксационные процессы, уменьшают подвижность и увеличивают жесткость макромолекул. Появление в РЦ возбужденного пигмента изменяет зарядовое состояние в донорно-акцепторном комплексе по сравнению с исходным. При этом изменяется баланс сил, определяющих равновесную конформацию системы, адаптированной к темноте. В ходе последующей релаксации с участием системы водородных связей и достигается новое равновесное состояние ион-радикальной пары, затем уже происходит перенос электрона на  $\text{Q}_\text{A}$  [17]. Волна индуцированных конформационных изменений, затрагивающая всю белковую глобулу переносчика, начинается в фемтосекундном диапазоне [43, 48].

Состояние водородных связей влияет на динамику фотоиндуцированных релаксационных процессов в системе. При модификации сетки водородных связей изотопным замещением  $\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$  и добавлением многоатомных спиртов и апротонных растворителей скорости разделения зарядов уменьшаются в 2–4 раза, при этом квантовая эффективность снижается на 10–12%. Таким образом, нарушение состояния водно-белкового окружения кофакторов, даже не затрагивающее взаимного расположения переносчиков электрона (расстояние, ориентация), приводят к существенному изменению скоростей и эффективности электрон-транспортных реакций [15, 17]. Полученные экспериментальные данные и теоретический анализ механизма отклика среды на возникновение неравновесных состояний переносчиков электронов позволили предложить энергетическую модель ППФ в РЦ *Rhodobacter sphaeroides* [49].

Динамика конформационных переходов способствует созданию выгодных конфигураций начальных и конечных состояний переносчиков для прямого транспорта и препятствует обратному. Так, индуцированная при переносе электрона конформационная подвижность обеспечивает стабилизацию фотомобилизованного электрона на хиноновых акцепторах  $\text{Q}_\text{A}$  и  $\text{Q}_\text{B}$ . Стабилизация электрона на вторичном хиноне  $\text{Q}_\text{B}$  также сопровож-

дается конформационными изменениями, которые методом рентгеноструктурного анализа выявляются в «замороженных» до 77 К на свету кристаллах комплексов бактериальных РЦ [24, 32, 38]. Наиболее хорошо изучены РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, для которых известны кристаллическая структура, а также последовательность и скорость фотоиндуцированных реакций. После возбуждения РЦ за 3,5 пс происходит разделение зарядов и перенос электрона на молекулу бактериофеофитина, а затем за 200 пс к хинонному акцептору  $Q_A$ . В РЦ *Rhodobacter sphaeroides* из трех гидрофобных белковых субъединиц (L, M, H) две (L и M), имеющие по пять  $\alpha$ -спиралей, несут электронные переносчики. Субъединица H не несет переносчиков, имеет только одну  $\alpha$ -спираль, наименее гидрофобна и прикрывает с цитоплазматической стороны область связывания хинонов  $Q_A$  и  $Q_B$ . Она наиболее полярна и имеет на межсубъединичной поверхности десятки молекул воды. Ее удаление трансформирует окружение переносчиков, влияя и на структуру водородных связей РЦ, и тем самым на скорость и глубину конформационного перехода ПБК после фоторазделения зарядов [33]. Вероятность участия поляризуемых боковых цепей белка и сети водородных связей РЦ в разделении и стабилизации зарядов обсуждается и другими исследователями [27, 39]. В конечном итоге модификация структурно-динамического состояния РЦ приводит к изменениям температурных и световых эффектов в процессе рекомбинации зарядов между восстановленным первичным хинонным акцептором и фотоокисленным димером бактериохлорофилла [11].

Состояние воды в окружении мембран и белковых глобул может существенно изменять эффективность электронтранспортных реакций. Процесс гидратации биологических структур не сводится к последовательности заполнения тех или иных участков поверхности белков и мембран, а связан с глубокими изменениями их структурно-динамических и функциональных характеристик. Методами  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии изучали динамику белкового компонента, полярных и неполярных участков фотосинтетических мембран пурпурных бактерий в условиях разной влажности. Особенно глубокие изменения структуры мембран (имеющих в ряде случаев нелинейную зависимость от влажности) происходят при внедрении воды в водородные связи внутри белков и между молекулами липидов, а также при появлении свободной воды с высокой диэлектрической постоянной. Показано, что появление свободной воды коррелирует с повышением эффективности электронного транспорта на участке цепи  $Q_A \rightarrow Q_B$  [1].

Экспериментальная модификация конформационного состояния макромолекул и мембранных комплексов была проведена нами также на хлоропластах высших растений. При ограничении конформационной под-

вижности мембранных структур мягкой фиксацией низкими концентрациями ГА, (образующего меж- и внутримолекулярные сшивки при взаимодействии с аминогруппами боковых цепей лизина и SH-группами белков) наблюдалось значительное подавление всех процессов, связанных с трансформацией энергии. Обращает на себя внимание тот факт, что фиксация низкими концентрациями ГА сказывается уже на начальных этапах ППФ, эффективности передачи поглощенной молекулами антенн световой энергии на РЦ, о чем можно судить по изменениям длительности компонентов флуоресценции, связанных с ФС 1 или ФС 2 [50]. При этом длительность флуоресценции ФС 1 при 10 мМ ГА возрастает сразу в два раза, дальнейшее увеличение жесткости мембраны уже не отражается на времени жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции ФС 2 при обработке нарастающими концентрациями ГА возрастает постепенно и достигает максимального значения при полной фиксации структуры тилакоида. Полученные результаты показывают, что эффективная передача энергии с ССК на РЦ связана с изменениями конформации (или подвижности) белковых матриц, с которыми связаны молекулы пигментов. Подтверждением этого является температурная зависимость времени жизни флуоресценции: при понижении температуры до минус 60–70°C, когда происходит резкое замедление или остановка конформационных движений макромолекулярных структур в водной фазе, наблюдается увеличение времени жизни флуоресценции хлорофилла вдвое и дальнейшее понижение температуры его уже практически не изменяет [50]. Обработка тилакоидов низкими концентрациями ГА не изменяет активности самих РЦ, упрятанных внутрь белковых глобул и не влияет на перенос электронов от воды до железо-серных белков на донорной стороне ФС 1, скорость электронного транспорта при низких концентрациях даже увеличивается вследствие его разобщения. Наиболее чувствительными к самым низким концентрациям оказались процессы, связанные с функционированием сопрягающего комплекса (каталитическая часть которого локализована на внешней поверхности мембраны тилакоида) – фотофосфорилирование и Mg-зависимая  $H^+$ -АТРаза. При этом еще сохраняется фотоиндуцированное поглощение протонов, медленный компонент замедленной флуоресценции и фотоиндуцированное тушение флуоресценции атебрина, которое рассматривают как показатель образования  $\Delta\mu H^+$ . Для их подавления необходимы большие концентрации ГА [50].

Поскольку сопрягающий комплекс в процессе функционирования изменяет конформацию под действием  $\Delta\mu H^+$ , можно было ожидать, что обработка тилакоидов в темноте и на свету (фиксация неэнергизованного и энергизованного состояния мембраны соответственно) будет влиять различно. Действительно, оказалось, что при обработке хлоропластов на свету наблюдается более сильное подавление процессов, связанных с запаса-



нием энергии. После световой фиксации наблюдается существенно более значительное уменьшение степени фотоиндуцированного тушения флуоресценции атебрина и ускорение его релаксации после выключения действующего света, по сравнению с фиксацией в темноте. Скорость нарастания медленной фазы индукционной кривой и стационарный уровень замедленной флуоресценции у тилакоидов, фиксированных на свету, падает значительно больше, чем у фиксированных той же концентрацией ГА в темноте. Обработка хлоропластов на свету фиксирует световую конформацию сопрягающего комплекса с «открытым» состоянием протонного канала, что увеличивает проводимость мембран для ионов, энергизованная мембрана не способна «удержать»  $\Delta\mu\text{H}^+$  и разряжается нефункциональным путем [51].

Итак, результаты комплексных исследований конформационной подвижности ПБК с использованием спектральных методов, ЭПР и мессбауеровской спектроскопии, спиновых меток для препаратов в суспензиях, порошках и пленках при различной степени гидратации позволил обосновать теоретические представления о роли электронно-конформационных взаимодействий в первичных процессах фотосинтеза [7, 15, 17]. Так, при идентификации математических моделей установлено различие эффективных значений констант скоростей переноса электронов между отдельными компонентами РЦ на свету и в темноте (масштаб различий 1–2 порядка), что подтверждает наличие разных конформационных состояний, которые отличаются взаимным расположением донорных и акцепторных компонентов и, как следствие, реакционной способностью и кинетическими характеристиками [13, 37].

### **Флуоресценция хлорофилла как параметр состояния фотосинтезирующих клеток**

Отдельные звенья трансформации энергии в системе ППФ испытывают влияние различных факторов эндогенной и экзогенной (загрязнение среды) природы. Это приводит к регуляторным перестройкам ЭТЦ и к изменению характера фотосинтеза. Накопленные данные фундаментальных исследований, некоторые из которых мы привели выше, в принципе позволяют расшифровать последовательность событий от момента воздействия внешнего фактора до изменения фотосинтеза на уровне его конечных продуктов. Вместе с тем очень важно найти такой показатель состояния ЭТЦ, который бы позволял в режиме реального времени непосредственно оценивать не только эффективность запасаения энергии света в ППФ, но и динамику ее изменений в различных условиях существования клеток (свет, температура, состав минеральных и биогенных элементов) во внеш-

ней среде. Это может дать в руки исследователей мощный инструмент для экологического мониторинга водных биоценозов, для управления ростом популяций клеток, культивируемых в фотобиореакторах.

Именно таким показателем является флуоресценция хлорофилла, локализованного в фотосинтетических мембранах клеток.

**Флуоресценция хлорофилла.** Не использованная в фотосинтезе энергия поглощенных квантов света диссипирует в тепло или излучается в виде флуоресценции. Подавляющая часть флуоресценции, наблюдаемой при изучении листьев высших растений или водорослей, генерируется в ФС 2. Вследствие высокой эффективности дезактивации возбужденного состояния П680 и разделения зарядов в РЦ, флуоресценция ФС 2 характеризуется низкими значениями квантового выхода (1—3%) и времени затухания (100—200 пс). Однако по изменению этих величин можно судить об эффективности основного фотосинтетического запасаения энергии электронного возбуждения П680 в различных условиях. В настоящее время параметры флуоресценции как показатель состояния и эффективности функционирования фотосинтетического аппарата широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях. Основная идея состоит в том, что уменьшение эффективности запасаения света в фотосинтезе приводит к увеличению интенсивности флуоресценции [17, 28].

Параметры кинетики флуоресценции хлорофилла  $a$  обладают большой информативностью для характеристики состояния ППФ. Это связано с тем, что изменения состояния фотосинтетического аппарата сопровождаются изменением вероятности тушения энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла, что и проявляется в изменении квантового выхода флуоресценции при освещении (эффект Каутского). Сложная кинетика нарастания переменной флуоресценции хлорофилла отражает последовательное заполнение различных пулов пластохинона на акцепторной стороне ФС 2, а кинетика затухания — гетерогенность окисления восстановленного пула. Исходный уровень флуоресценции ( $F_0$ ) определяется флуоресценцией хлорофилла в условиях, когда все РЦ находятся в «открытом» рабочем состоянии и способны тушить флуоресценцию антенны, поскольку все молекулы первичного хинонного акцептора  $Q_A$  готовы принять электрон от П680. Если все молекулы  $Q_A$  восстановлены (на свету), РЦ «закрыт», т.к. перенос электронов от П680 на феофитин невозможен в силу электростатического отталкивания. Поэтому энергия электронного возбуждения большей частью возвращается в антенну и уровень флуоресценции становится максимальным ( $F_m$ ). Разница между  $F_m$  и  $F_0$  называется переменной флуоресценцией ( $F_v = F_m - F_0$ ). Она обусловлена той частью световой энергии, которая в первичных реакциях фотосинтеза утилизируется при открытых РЦ.

В адаптированных к темноте листьях все центры фотохимически активны и флуоресценция соответствует уровню  $F_0$ . При освещении их насыщающей вспышкой флуоресценция становится максимальной ( $F_m$ ) и быстро релаксирует в темноте до исходного уровня. Величина отношения  $F_v/F_m$  коррелирует с квантовым выходом фотосинтеза, что позволяет использовать этот параметр для характеристики процессов фотосинтеза даже на целых фотосинтезирующих объектах.

На постоянном свете происходит частичное восстановление  $Q_A$ . Освещение образца на этом фоне постоянного освещения насыщающей фотосинтез вспышкой увеличивает уровень флуоресценции, но только до величины  $F_m'$ , меньшей чем  $F_m$ , т.к. имеет место нефотохимическое тушение флуоресценции, связанное с диссипацией части энергии возбуждения в РЦ и фотосинтетической антенне. Оно обусловлено по крайней мере тремя процессами: энергизационным  $\Delta pH$ -зависимым тушением, уменьшением сечения поглощения ФС 2 вследствие перехода части фосфорилированных ССК к ФС 1 и фотоингибированием ФС 2. Таким образом, разница между максимальной флуоресценцией  $F_m$  и  $F_m'$  обусловлена той частью флуоресценции, которая тушится за счет нефотохимических процессов. Все эти процессы отражаются на кинетической кривой, которая имеет немонокотный характер. При длительной экспозиции листьев на сильном свете флуоресценция сначала возрастает до  $F_m$ , затем снижается до  $F_m'$  за счет нефотохимического тушения [28].

Восстановленный  $Q_A^-$  легко отдает электрон на  $Q_B$ , который затем передает его в пул свободных пластохинонов. После однократного возбуждения РЦ короткой интенсивной вспышкой окисление  $Q_A$  сопровождается быстрой релаксацией переменной флуоресценции за счет переноса электронов с  $Q_A$  на  $Q_B$ . Небольшой долгоживущий компонент в кинетике окисления  $Q_A$  связан с наличием в популяции реакционных центров некоторого числа «неактивных», в которых перенос с  $Q_A$  к  $Q_B$  невозможен. Более сложная ситуация наблюдается, когда ФС 2 возбуждается многократно. Восстановленные молекулы  $Q_B$  передают электроны в пластохиноновый пул. Поэтому степень восстановленности  $Q_B$ , зависит от редокс-состояния пула. Его окисленность зависит, в свою очередь, от линейного электронного транспорта через ФС 1 и далее к конечным акцепторам, таким как  $CO_2$ . После длительного периода темноты Рубиско неактивна, и фиксация  $CO_2$  не происходит. По этой причине пул пластохинонов может быть восстановлен даже в первый момент освещения. В таком случае последующие электроны с  $Q_A^-$  смогут переноситься только обратно в донорную часть ФС 2, что скажется на кинетической кривой. Таким образом, очевидно, что кинетика темновой релаксации переменной флуоресценции связана с состоянием  $Q_B$ , и пластохинонового пула. Все изложенное выше указывает, что по характеру кинетической кривой и других па-

параметров флуоресценции (см. ниже) можно судить об изменениях в цепи электронного транспорта.

Изучение фундаментальных механизмов флуоресценции и выяснение их взаимосвязи с работой ЭТЦ и сопряженными с ней процессами являются основой для использования параметров флуоресценции в решении прикладных задач, требующих получения характеристики физиологического состояния растения. Применение техники с высоким временным разрешением позволяет проанализировать кинетики нарастания и спада флуоресценции. Нарастание переменной флуоресценции от уровня  $F_o$  до  $F_m$  имеет три фазы. Начальная, быстрая фаза подъема протекает за 1 мс. Более медленные фазы – за времена порядка 30 и 300 мс соответственно. Амплитуда наиболее медленной фазы нарастания флуоресценции (в отличие от двух других) существенно снижалась при обработке листьев метилвиологеном (МВ), который акцептирует электроны от ФС 1 в условиях, когда ферменты цикла фиксации  $CO_2$  неактивны, и окисляет переносчики ЭТЦ между ФС. Есть основания считать, что медленная фаза связана с восстановлением  $Q_A$  в ФС 2<sub>р</sub>-центрах, характеризующихся малым размером светособирающей антенны.

В кинетике темновой релаксации переменной флуоресценции контрольных листьев также обнаружено три кинетических компонента с временами полураспада 8 мс, 105 мс, и 850 мс. Полученные данные указывают на сложность путей реокисления  $Q_A$  и зависимость их от уровня восстановленности переносчиков электронов между ФС. Показано, что средний компонент связан с наличием узкого места на акцепторной стороне ФС 1 [6, 22].

**Роль пластохинонов в регуляции активности ФС 2.** Большая роль пластохинонового пула в метаболизме растительной клетки связана также с тем, что через этот пул осуществляется взаимодействие фотосинтетической ЭТЦ с дыхательной. Субстратом хлоропластного дыхания служит NADH, образующийся при гликолитическом расщеплении углеводов. NADH-дегидрогеназа восстанавливает пул пластохинонов, который может быть окислен хинон-редуктазой [21]. При целом ряде неблагоприятных физиологических воздействий, сопровождающихся снижением роста культуры хлореллы (азотное голодание, тепловой шок и др.), наблюдается инактивация ФС 2, проявляющаяся, в частности, в снижении переменной флуоресценции. Наблюдаемое уменьшение величины  $F_v/F_m$  обусловлено главным образом повышением в этих условиях уровня  $F_o$ , что указывает на необратимое восстановление или потерю первичного акцептора электронов  $Q_A$  в ФС 2 [18]. Было показано также, что инактивация ФС 2 связана с накоплением в хлоропластах продуктов фотосинтеза, которые не могут использоваться для роста. Потеря реакционными центрами ФС 2 способности к фотохимическому тушению является проявлением

регуляторного механизма, ингибирующего фотосинтез при избыточном накоплении в хлоропласте продуктов углеводного метаболизма, общих для гликолиза и цикла Кальвина. Факторы, препятствующие накоплению субстратов хлоропластного дыхания (отсутствие  $\text{CO}_2$ , торможение метаболизма глюкозы ее неметаболизируемым аналогом 2-дезоксиглюкозой, ингибирование синтеза белка), предотвращали инактивацию ФС 2 в клетках хлореллы. Ингибирование диуроном транспорта электронов между  $Q_A$  и  $Q_B$  не влияло на хлоропластное дыхание, но предотвращало инактивацию ФС 2. Механизм инактивации связан с потерей ФС 2 первичного хинонного акцептора после его двухэлектронного восстановления от пластохинона за счет потока электронов от субстратов хлоропластного дыхания. Полученные результаты указывают на существование единого механизма метаболической регуляции активности ФС 2 при различных по своей природе воздействиях. В результате взаимодействия восстановленного дыхательной цепью пластохинона с первичным акцептором электронов ФС 2 происходит снижение скорости фотосинтетического потока электронов до уровня, соответствующего потребностям клетки [52].

Важная роль пула хинонов в поддержании оптимального уровня первичных процессов фотосинтеза была продемонстрирована на микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, которая способна к длительному (несколько дней) интенсивному образованию  $\text{H}_2$  на свету после полуторядух суток голодания (инкубация в среде с дефицитом серы). Это явление используется в исследованиях водородных источников энергии. Было показано, что серное голодание в течение первых суток вызывает значительное снижение скорости фотосинтеза в результате инактивации 85–90% ФС 2 [41]. Когда скорость фотосинтетического образования  $\text{O}_2$  становится ниже скорости дыхания, культура переходит в анаэробные условия и через некоторое время начинается выделение  $\text{H}_2$ . Для изучения механизмов изменения активности ФС 2 в процессе серного голодания при переходе культуры к анаэробным условиям и ее участия в образовании  $\text{H}_2$  регистрировали изменения параметров флуоресценции на всех стадиях адаптации клеток *C. reinhardtii* к недостатку серы методом импульсной флуориметрии. Было показано, что постепенное уменьшение активности ФС 2 во время аэробной стадии, при наступлении анаэробных условий сменяется быстрой и полной ее инактивацией. Затем начинается медленная реактивация части ФС 2 с одновременным образованием  $\text{H}_2$ . При этом характер изменения активности ФС 2 качественно коррелирует со скоростью образования  $\text{H}_2$ , что указывает на участие ФС 2 в передаче электронов через ФС 1 и Фд гидрогеназе [53, 54]. Механизм медленной инактивации ФС 2, видимо, аналогичен описанному ранее для эукариотических водорослей в условиях недостатка различных биогенных элементов.

Механизм быстрой инактивации ФС 2 у голодающих по сере клеток *C. reinhardtii* при переходе к анаэробным условиям также может быть связан с восстановлением пула хинонов. Возникающий дефицит  $O_2$  делает невозможным функционирование конечной оксидазы хлоропластного дыхания, что приводит к повышению восстановленности пула пластохинонов. Это, в свою очередь, вызывает подавление активности ФС 2 и соответственно уменьшение скорости фотосинтетического образования  $O_2$ . Частичная реактивация ФС 2 в анаэробных условиях, по всей видимости, обусловлена активацией гидрогеназы, которая через Фд окисляет ЭТЦ фотосинтеза, в том числе пул пластохинонов. В результате частичного окисления пула увеличивается отток электронов от ФС2, что, в свою очередь, повышает эффективность работы цепи фотосинтеза. Процесс выделения водорода позволяет сохранить часть активных центров ФС 2 в анаэробных условиях при серном голодании, что предотвращает их полную деструкцию и одновременно обеспечивает клетку некоторым количеством  $O_2$ . Активация гидрогеназы является механизмом, защищающим ФС 2 от деструкции в условиях голодания. Таким образом, редокс-состояние пластохинонового пула играет важную роль в физиологической регуляции активности ФС 2 на протяжении всех этапов серного голодания культуры. В свою очередь, степень восстановленности пула определяется соотношением скоростей реакций фотосинтеза, хлоропластного дыхания и образования водорода [54].

Изложенные выше данные о механизмах и регуляции ППФ легли в основу получения и анализа информации о состоянии фитопланктона с помощью флуоресцентных методов.

### **Флуориметрические методы и аппаратуры для экологического мониторинга водорослей и высших растений**

На кафедре биофизики Биологического факультета МГУ разработан комплекс флуориметрических экспресс-методов и созданы технические устройства для диагностики состояния фотосинтетического аппарата высших растений и водорослей в природных условиях [68]. В режиме реального времени эти методы дают информацию о состоянии фотосинтетического аппарата, эффективности фотосинтеза, а также суточную и сезонную динамику этих характеристик, обилии фитопланктона в природных условиях. Они позволяют детектировать наличие повреждений при действии антропогенных загрязнений, повышенных интенсивностей солнечной и УФ-радиации, дефицита элементов минерального питания, температуры задолго до того, как они найдут свое внешнее проявление, в частности уменьшение численности клеток. В этом состоит одно из главных преимуществ экспресс-методов в экологическом мониторинге. На сегодняш-

ний день обосновано применение показателя эффективности запасаания энергии электронного возбуждения в РЦ. Этот параметр определяется путем сравнения величин интенсивности флуоресценции ( $F_0$ ) при активном состоянии ЭТЦ, когда все реакционные центры открыты, и максимальной интенсивности флуоресценции ( $F_m$ ) при закрытых реакционных центрах. Закрытие центров вызывается обычно мощной насыщающей вспышкой света, при которой восстанавливаются хинонные акцепторы, а центры переходят в закрытое состояние, где уровень флуоресценции максимален ( $F_m$ ). Разность величин  $F_v = F_m - F_0$  называется переменной флуоресценцией, а отношение

$$\frac{F_m - F_0}{F_m} = \frac{F_v}{F_m} \quad (1)$$

равно эффективности использования энергии света в реакционных центрах или эффективности фотохимического тушения флуоресценции. Эта величина ( $F_v/F_m$ ), определенная в адаптированных к темноте или слабому освещению клетках, дает информацию о максимальной потенциальной активности ППФ. В реальных условиях освещения развиваются процессы (в течение 1–2 минут), ведущие к уменьшению отношения ( $F_v/F_m$ ), найденного для клеток, адаптированных к темноте. Как говорилось выше, наиболее важными здесь являются нефотохимические процессы тушения, вызванные энергизацией мембран с образованием трансмембранной разности концентрации ионов водорода ( $\Delta pH$ ) – движущей силы синтеза АТФ. Наряду с этим в нефотохимическом тушении флуоресценции, проходящему по индуктивно-резонансному механизму, принимает участие каратиноид зеаксантин, который образуется из виолоксантина в реакции эпоксидации, протекающей с потреблением ионов водорода. Этот вид тушения носит защитный характер. Он возникает при избыточном образовании  $\Delta pH$  и насыщении фотосинтеза и способствует дезактивации неиспользованных возбужденных состояний хлорофилла, предотвращая тем самым образование активных форм кислорода в этих условиях. Такого рода нефотохимическое тушение уменьшает величину максимальной флуоресценции  $F_m$  при действии насыщающей вспышки света до уровня  $F_m'$  ( $F_m' < F_m$ ). Снижение величины  $F_m$  может также вызываться и прямым фотоокислением РЦ с распадом его белка ( $D_1$ ) при высокоинтенсивных световых потоках солнечной и УФ-радиации. Кинетика последующего в темноте восстановления величины  $F_m$  отражает динамику синтеза фотоокисленного белка РЦ и дает тем самым самую информацию об общих процессах биосинтеза белка в клетках. При постоянном (не насыщающем фотосинтез) освещении по мере восстановления переносчиков (хинонов) в ЭТЦ реакционные центры частично переходят в «закрытое» состояние, что сопровождается некоторым увеличением флуоресценции ( $F_0$ ) до величины

$F_t$ . В условиях постоянного освещения при нефотохимическом тушении с уменьшением  $F_m$  до  $F_m'$  и частичном восстановлении переносчиков в ЭТЦ с увеличением  $F_0$  до  $F_t$  реальная способность фотосинтетического аппарата к фотохимическому тушению флуоресценции хлорофилла уменьшается. Она определяется коэффициентом фотохимического тушения

$$qP = \frac{F_m' - F_t}{F_m - F_0}, \quad (2)$$

а степень нефотохимического тушения – коэффициентом нефотохимического тушения

$$qN = \frac{F_m - F_m'}{F_m - F_0}. \quad (3)$$

В настоящее время принято, что определение величин  $qP$ ,  $qN$ ,  $F_v/F_m$ , интенсивности флуоресценции  $F_0$  с одновременной регистрацией температуры и освещенности объектов дает общую информацию о состоянии и обилии клеток. Однако, как видно из выражений (5–7), изменение коэффициентов  $qP$  и  $qN$  может быть вызвано разными причинами, иногда действующими в противоположных направлениях. Например, интенсивное фотоокисление РЦ может сопровождаться также окислением части антенного хлорофилла, что приводит к падению величины не только  $F_m$ , но и  $F_0$ . Однако само по себе уменьшение числа РЦ при их фотоокислении, отражающееся в уменьшении  $F_m$ , должно, наоборот, приводить также и к противоположному росту  $F_0$ . Это происходит в силу снижения вероятности тушения возбуждения в антенне оставшимися в меньшем числе реакционными центрами. Необходимо также понимать, что  $\Delta pH$  – зависимое энергизированное тушение – носит «полезный» характер, коррелируя с «полезным» для клетки синтезом АТФ в отличие от «картиноидной» компоненты нефотохимического тушения, имеющего защитное значение. Соотношение между этими компонентами может меняться в зависимости от условий освещения. Помимо фактора светового освещения свой вклад в наблюдаемые изменения параметров флуоресценции ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_m'$ ,  $F_t$ ,  $F_v/F_m$ ) дают также температура, состав и наличие элементов минерального питания, присутствие ингибиторов, влияющих как на отдельные этапы ППФ, так и на биосинтез белка РЦ. Так, соли «тяжелых металлов» ингибируют процессы биосинтеза белка РЦ, уменьшая их скорость. Тем самым снижается стационарная концентрация активных РЦ вследствие постоянно идущих процессов их фотодеструкции на свету. Это приводит к снижению отношения  $F_v/F_m$  за счет уменьшения величины  $F_m$  и замедлению скорости ее восстановления в темноте после окислительного стресса. Именно такая экспресс-информация указывает на присутствие в водной среде антропогенных загрязнений, ингибирующих биосинтез белка в клетке. Чувствительность этого метода позволяет определить низкие сублетальные концентрации солей тяжелых ме-



таллов по уменьшению  $F_m$ , когда еще не происходит видимой гибели клеток, которой будет соответствовать уменьшение уже общей интенсивности флуоресценции  $F_0$  (55).

При голодании в условиях недостатка элементов минерального питания и невозможности вследствие этого полностью реализовать избыточное количество продуктов световой стадии, в клетках развивается циклический поток электронов, восстанавливающий через цепь хлоропластного дыхания пул пластохинонов, что предшествует разделению зарядов в РЦ фотосистемы 2. В результате происходит обращение части электронного потока на уровне первичных хинонных акцепторов фотосистемы 2 и генерация компоненты флуоресценции хлорофилла с временем жизни  $\sim 2$  нс [56]. Это отражается в увеличении общей флуоресценции  $F_0$  и в соответствующем снижении отношения (5)  $F_v/F_m$ . Описанное явление также носит защитный характер, так как сброс избытка возбуждения в виде флуоресценции предотвращает активацию молекул кислорода с образованием активных форм, которое не происходит за столь короткое время. Таким образом, на основе измерений величин  $F_0$ ,  $F_v/F_m$ ,  $qP$ ,  $qN$  может быть получена общая информация о состоянии и обилии фитопланктона и их динамике. Вместе с тем для глубокого понимания причин и механизмов наблюдаемых эффектов необходимо сопоставлять эти данные с характером изменений отдельных параметров флуоресценции  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_t$  и анализом формы индукционной кривой флуоресценции методами математического моделирования (см. выше).

Рассмотрим теперь данные по исследованию количества и состояния фитопланктона в природных условиях, полученные с применением разработанных нами специальных приборов.

**Зонд-флуорометр.** Изучение характеристик природного фитопланктона *in situ* предполагает необходимость зондовых измерений по всей глубине фотической зоны водоема, которая в океане может достигать 200 м. с высоким быстродействием при измерениях. Кроме того, устройство должно обладать высокой чувствительностью, так как минимальное содержание хлорофилла в природных водах (алиготрофные зоны океана) может составлять до 0,01 мкг/л.

На кафедре биофизики был создан зонд-флуорометр, способный работать до глубины 200 м, для измерения параметров флуоресценции ( $F_0$ ,  $F_m$  и  $(F_m - F_0)/F_m$ ) природного фитопланктона в естественных условиях с одновременной регистрацией температуры и подводной освещенности [57, 58, 59]. Прибор состоит из погружаемого прочного корпуса с оптикоэлектронной системой измерения, соединенной кабель-тросом с блоком питания и ЮМ-совместимым компьютером, управляющим процессом измерений по программе, задаваемой пользователем. Регистрирующая часть зонда состоит из фотоумножителя, усилителя сигналов, аналого-цифрового преобразователя,

интерфейса связи с компьютером и двух независимых импульсных источников света с длительностью вспышек 0,01 мс (спектральная область 400–480 нм). Измерение всех параметров производится автоматически, и результаты выводятся на экран компьютера в реальном времени по мере погружения аппарата в виде графиков, отражающих вертикальный профиль температуры, подводной освещенности, величин  $F_0$  и  $F_m$  в относительных единицах, показатель эффективности фотосинтеза водорослей  $(F_m - F_0)/F_m$ , а также концентрацию хлорофилла  $a$  (объема фитопланктона), рассчитанную по величине  $F_0$  в соответствии с калибровкой. На рис. 3 приведена схема зондирования фитопланктона в море.

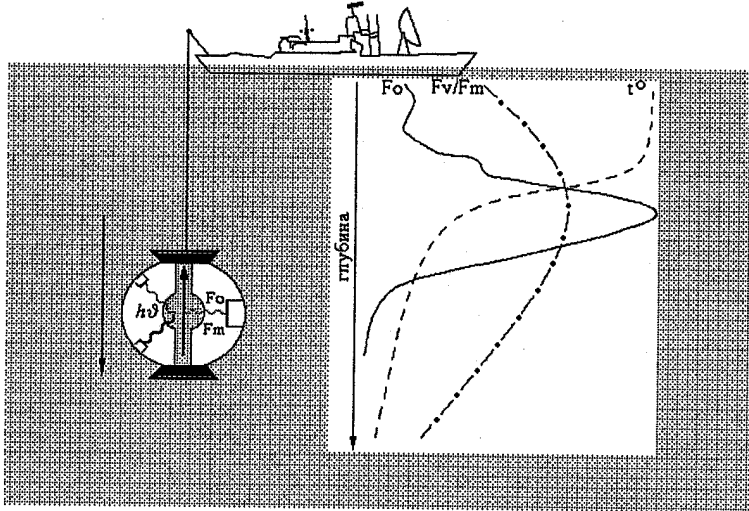


Рис. 3. Схема морского зондирования фитопланктона с использованием погружного импульсного флуорометра

На рисунке 4 представлено одно из типичных распределений фитопланктона, когда наибольшее количество и фотосинтетическая активность клеток наблюдается на глубине градиентного по температуре слоя воды. В поверхностных слоях фотосинтез угнетается избыточными для фитопланктона интенсивностями солнечного света.

При помощи зонда-флуорометра были проведены обследования акваторий Черного и Балтийских морей, озёр Байкал и Иссык-Куль и других водоёмов. В качестве примера приведены некоторые результаты зондовых измерений, которые позволили построить распределения в верхнем перемешиваемом слое воды средних значений концентрации хлорофилла, и относительной переменной флуоресценции (рис. 4), а также распределения хлорофилла и относительной переменной флуоресценции по глубине (рис. 5).

Полученные данные иллюстрируют возможность использования погружного флуоресцентного зонда для определения скорости фотосинтеза фитопланктона по характеристикам первичных реакций фотосинтеза.

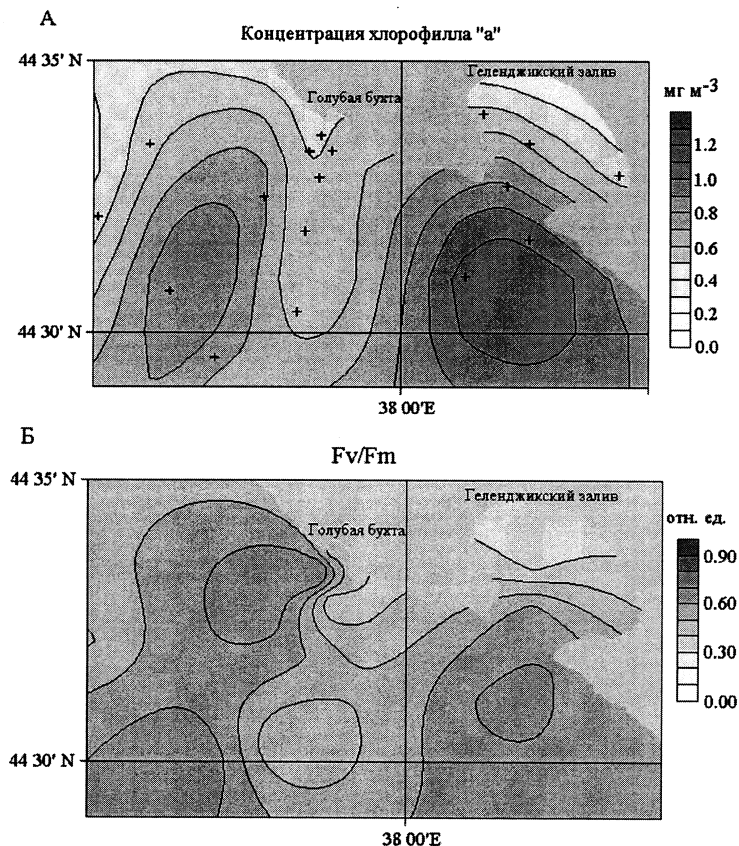


Рис. 4. Распределение в верхнем перемешиваемом слое воды средних значений концентрации хлорофилла, определенной по  $F_0$  (а), и относительной переменной флуоресценции  $F_v/F_m$  в прибрежных водах Черного моря вблизи Геленджика (б). Данные получены в первой половине сентября 1998 г.

Эффективность ППФ, определенная как отношение  $F_v/F_m$ , коррелирует со скоростью роста популяций клеток. Однако эта взаимосвязь между увеличением числа клеток и ослаблением  $F_v/F_m$  носит нелинейный характер, при котором не наблюдается роста популяции и увеличения числа клеток, когда величина квантового выхода ППФ  $F_v/F_m$  ниже 0,3 [66, 67]. Очевидно, в этих условиях запасенной в ППФ энергии света хватает лишь

3. Проблемы регуляции в живых и предбиологических системах

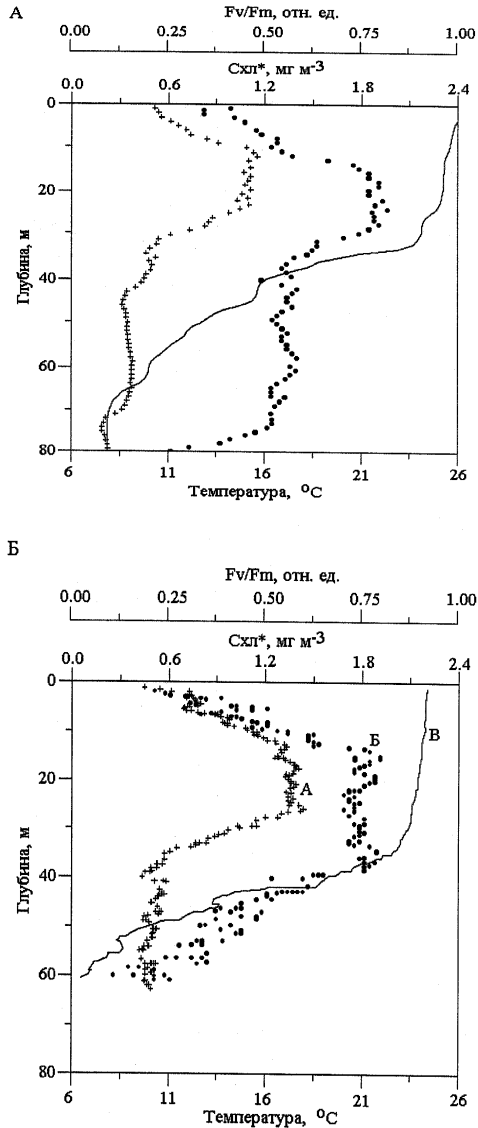


Рис. 5. Типичные примеры вертикального распределения концентрации хлорофилла (а), определенной по  $F_0$ , относительной переменной флуоресценции  $F_v/F_m$  и температуры ( $T$ ) воды (б), полученные в первой половине сентября 1999 г. (1) и 2000 г. (2) вблизи Голубой бухты Черного моря (станции № 54 и № 2 соответственно; расположены в одном районе)

на покрытие энергетических затрат клетки, но недостаточно для обеспечения ее активного роста и размножения. Эффективность фотосинтеза водорослей в естественных условиях не сохраняется постоянной, а меняется в разные периоды их развития, а также в течение суток в зависимости от условий освещения (утренние, дневные, вечерние часы). Это явление носит активный адаптационный характер в результате регуляторных изменений в фотосинтетическом аппарате в соответствии с физиологическим состоянием клетки. Так, на озере Байкал было обнаружено [60], что увеличение фотосинтетической активности и появление клеток с высоким показателем  $F_v/F_m$  наступает в декабре-феврале и предшествует периоду цветения водорослей (март), когда происходит резкое увеличение их числа. Аналогичное явление было обнаружено в водах северо-западного района Черного моря [61, 62].

Интенсивность солнечной радиации оказывает влияние на активность ППФ, которая изменяется в течение суток. Это отражает хорошо известное явление полуденной депрессии фотосинтеза, которое, как оказалось, сопровождалось падением величины  $F_v/F_m$ . Характер уменьшения  $F_v/F_m$  в полуденные часы наибольшей освещенности зависит от степени обогащения водной среды элементами минерального питания. В обогащенных эвтрофных водах отношение  $F_v/F_m$  остается почти неизменным в течение дня даже в поверхностных слоях воды, где освещенность высокая (кривая 2, рис. 6), это в основном вызвано уменьшением  $F_m$  вследствие ингибирования РЦ. В бедных олиготрофных водоемах более глубокое падение  $F_v/F_m$  в дневные часы (кривая в) связано также и с увеличением  $F_0$ , которое, как было показано выше, обусловлено обращением части электронного потока и генерацией флуоресценции в ФС2 в условиях голодания, что носит защитный характер, направленный против окислительного стресса.

Система ППФ, адаптируясь к различным внешним условиям, активно регулирует свое состояние таким образом, чтобы обеспечить оптимальное соотношение скоростей световых и темновых стадий для поддержания необходимого уровня фотосинтеза и клеточного метаболизма. Ключевую регуляторную роль здесь играет направленное изменение клеточной активности ФС2, что определяется сложным взаимодействием процессов фотодеструкции и репарации белков РЦ в зависимости от условий освещения и температуры, содержания элементов минерального питания в среде.

Помимо приведенных в настоящей статье методов измерения параметров флуоресценции хлорофилла, на кафедре разработаны также методы высокотемпературной термолюминесценции хлорофилла для определения степени инактивации фотосинтетических процессов фитопланктона в природных условиях [63]. Другой микроспектрофотометрический метод

позволяет исследовать структуру фитопланктонного сообщества путем определения флуоресцентных показателей интенсивности фотосинтеза индивидуальных клеток массовых видов водорослей [61].

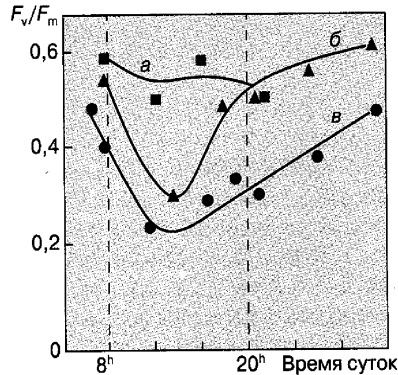


Рис. 6. Типичные суточные изменения выхода флуоресценции хлорофилла фитопланктона  $F_v/F_m$  поверхностных слоев воды в зависимости от времени суток и количества питательных веществ для клеток водорослей

Кроме того, разработанные нами методы измерения флуоресценции хлорофилла были использованы для мониторинга состояния высших растений в зеленых насаждениях на нескольких улицах Москвы. Оказалось, что в неблагоприятных районах величина  $F_v/F_m$ , измеренная для отдельных ветвей деревьев, и ее статистические параметры (отклонения от среднего) достоверно коррелируют со степенью загрязнения [64, 65].

Таким образом, показатели флуоресценции хлорофилла ассимиляционных тканей высших растений могут быть использованы для мониторинга их состояния и оценки благополучия среды обитания.

### **Перспективы использования флуоресцентных методов в экологическом мониторинге**

На долю фитопланктона приходится почти половина фотосинтетической биологической продукции Земли. В морских экосистемах фитопланктон является главным источником органического вещества и фундаментом практически всех пищевых цепей. Поэтому обилие фитопланктона является одним из необходимых показателей экологического состояния акваторий, что нашло отражение в нормативных документах России и других стран.

В 50-е годы прошлого века были разработаны спектрофотометрические методы определения хлорофилла в экстрактах органических рас-

творителей. С тех пор мерой обилия водорослей было принято считать содержание в них хлорофилла *a*. Принципиальный недостаток такого подхода давно известен специалистам и неоднократно обсуждался. Хотя все водоросли содержат хлорофилл *a*, различные таксономические группы фитопланктона имеют значительно различающийся набор пигментов, ассоциированных в фотосинтетический аппарат. Соотношение между содержанием хлорофилла *a* и дополнительных фотосинтетических пигментов может варьировать в широких пределах у различных групп водорослей и зависит от условий обитания водорослей.

Анализ современных подходов к определению обилия фитопланктона и большой опыт российских и зарубежных исследований показывает, что наиболее оперативным и чувствительным для решения этой задачи являются измерения интенсивности флуоресценции хлорофилла водорослей в природной воде. Именно в последнее десятилетие и были разработаны и испытаны флуориметрические методы определения обилия фитопланктона.

Использование флуориметрического метода для определения хлорофилла в составе фитопланктонных водорослей не предполагает какой-либо предварительной подготовки воды для измерения. В современных приборах время измерения интенсивности флуоресценции не превосходит 5 секунд для самых бедных по содержанию фитопланктона вод. При помощи погружаемого зонда-флуорометра можно получить распределение хлорофилла по глубине, не извлекая на поверхность проб воды. Одновременное использование проточного флуорометра позволяет также проводить измерения содержания хлорофилла фитопланктона приповерхностных вод по ходу судна или вести непрерывный контроль этого показателя в течение длительного времени с платформы, буя или судна. Получаемая информация обрабатывается статистическими методами, запоминается в файлы и может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме.

Таким образом, измерение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* позволяет надежно определить содержание хлорофилла *a* в составе водорослей природных вод, без обработки водных проб в режиме реального времени при автоматических измерениях. Это позволяет рекомендовать данный метод для включения в системы экологического мониторинга водной среды по содержанию в ней хлорофилла *a* в составе фитопланктона морских акваторий.

Эти же методы эффективны и для биоиндикации состояния водной среды обитания. Для контроля качества морской воды регламентирована программа (ГОСТ 17.1.3.08-82) определения ряда гидрохимических (8 обязательных и 6 дополнительных параметров в зависимости от акватории) и 14 гидробиологических показателей, в число которых входят

концентрация хлорофилла и интенсивность фотосинтеза фитопланктона. Получение такой обширной информации для контроля качества морской воды с периодичностью проведения обследований до 2 раз в месяц чрезвычайно сложно реализовать и зачастую не является необходимым. Вместе с тем наиболее рациональным и целесообразным представляется использование подходов, основанных на принципе биоиндикации. Они позволяют получить интегральную оценку экологического благополучия среды на основе измерения нескольких ключевых параметров состояния живых организмов. Естественным объектом биоиндикации в морской экосистеме являются сообщества фитопланктона, составляющие основу первичной продукции в море. Эффективность функционирования фотосинтетического аппарата представляется наиболее важным признаком для биоиндикации экологического благополучия и прогнозирования развития морского фитопланктона. Этот признак имеет особенно большое значение для контроля загрязнения водной среды различными токсическими продуктами (ионами тяжелых металлов, фенолами, хлорорганическими соединениями, гербицидами, пестицидами, детергентами, легкими углеводородами и многими другими загрязняющими воду агентами), которые приводят к снижению эффективности фотосинтеза водорослей.

Разработанный нами комплекс флуоресцентных методов позволяет определять обилие фитопланктона (содержание хлорофилла *a*) и эффективность работы фотосинтетического аппарата на разной глубине («in situ») при помощи зонд-флуорометра; определять те же показатели в поверхностных водах по ходу судна и на его стоянках при помощи проточного флуорометра; детально исследовать регуляторные и адаптационные характеристики ФСА водорослей в пробах воды, извлеченной с выбранных горизонтов; оценивать функциональное состояние и определять вклад определенных видов водорослей в продукционные характеристики фитопланктонного сообщества при помощи микрофлуорометра. В результате цикла работ на Черном, Балтийском и Каспийском морях, на Байкале, Иссык-Куле и других акваториях получены горизонтальные и вертикальные профили распределения фитопланктона и эффективности первичных процессов фотосинтеза в водной толще. Для ряда акваторий проведено также картирование распределения токсических веществ по состоянию фитопланктонных организмов.

Представленная методология и комплексное использование флуорометрической аппаратура дают новую информацию о пространственно-временной изменчивости фитопланктона и могут также служить важной составной частью общей системы экологического мониторинга состояния вод. Особо следует отметить огромные перспективы использования данных флуорометрического анализа фитопланктона локальных ак-



ваторий (в качестве опорных точек) в сочетании со спутниковой информацией о цветности вод.

В ряде стран (США, Германия, Англия и др.) результаты, полученные при помощи подобного рода флуорометрических методов определения обилия фитопланктона, входят в официальные отчеты по экологическому обследованию акваторий.

В настоящее время для проведения эффективного экологического мониторинга на территории Российской Федерации на основе разработанных флуоресцентных методов и аппаратуры необходима разработка нормативной базы и принятие соответствующих документов, регламентирующих их применение.

## **Литература**

1. Аксенов С.И., Нокс П.П., Рубин А.Б. (1999) *Биофизика*, 44, 442-447.
2. Беляева Н.Е., Демин О.В., Лебедева Г.В., Ризниченко Г. Ю., Рубин А.Б. (2001) *Математика. Компьютер. Образование*, 8, часть 2, М.—Ижевск: РХД, 564-572.
3. Бухов Н. Г., Дамиров Х. Г., Джибладзе Т.Г., Ризниченко Г.Ю., Карапетян Н.В., Рубин А.Б. (1988) *Научные доклады высшей школы. Биологические науки*, 4, 28—37.
4. Воробьева Т.Н., Кренделева Т.Е., Ризниченко Г.Ю., Шайтан К.В., Рубин А.Б. (1983) *Молекулярная биология*, 20, 1203-1210.
5. Воронова Е.Н., Волкова Э.В., Казимирко Ю.В., Чивкунова О.Б., Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Рубин А.Б. (2002) *Физиология растений*. 49, 350-358.
6. Егорова Е.А., Бухов Н.Г., Кренделева Т.Е., Рубин А.Б. (2001) *Доклады Академии Наук*, 377, 1—4.
7. Кононенко А.А., Нокс П.П., Чаморовский С.К., Рубин А.Б., Лихтенштейн Г.И., Крулянский Ю. Ф., Суздаев И.П., Гольданский В.И. (1986) *Химическая физика*, 5, 795—803.
8. Кукушкин А.К., Тихонов А.Н. *Лекции по биофизике фотосинтеза* (1988) М.: МГУ, 320с.
9. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б., Демин О.В. (2000) *Журнал физической химии*, 74, 1874-1883.
10. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Демин О.В. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. (2002) *Биофизика*, 47, 1044-1058.
11. Нокс П.П., Чурбанова И.Ю., Захарова Н.И., Красильников П.М., Лукашев Е.П., Рубин А.Б., Шайтан К.В. (2001) *Биохимия*, 66, 114-118.

12. Ризниченко Г. Ю. (1991) Математические модели первичных процессов фотосинтеза. Итоги науки и техники, серия биофизика, 31, М.: ВИНТИ, 160с,
13. Ризниченко Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии (2002) М.—Ижевск: Регулярная и хаотическая динамика, 232 с
14. Ризниченко Г.Ю., Лебедева Г.В., Демин О.В., Беляева Н.Е, Рубин А.Б. (2000) Биофизика, 45, 452 - 460.
15. Рубин А.Б. Принципы организации и регуляции первичных процессов фотосинтеза Тимирязевские чтения LV (1995). Пушино ОНТИ ПНЦ РАН, 38 с.
16. Рубин А.Б. Биофизика, т. 1 (1999) М.: Книжныйдом «Университет», 372-418.
17. Рубин А.Б. Биофизика, т. 2 (2000) М.: Книжныйдом «Университет», 273-385.
18. Чемерис Ю.К., Попова А.В., АрутюнянАЛ., Венедиктов Я.С. (1999) Физиология растений, 36, 56—66.
19. Allen, J.F., Forsberg, J. (2001) TRENDS in Plant Sci.,6, 317-326.
20. Bendall, D.S., Manasse, R.S. (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1229,23-38.
21. Bennoun, P. (1999) FEBS Lett., 156, 363-365.
22. Bukhov, N., Egorova, E., Krendeleva, T., Rubin, A., Weis, Ch., Heber, U. (2001) Photosynth. Res., 70,155-166.
23. Dau, H. (1994) Photochem. Photobiol.,60, 1-23.
24. Fiorentini, C., Arancia, G., Caprioli, A., Fa I bo, V., Rugger, P.M., Donelli, G. (1988) Toxicon,26, 1047-1056.
25. Fulgosi,A., Vener,A.V.,Alschmied, L., Herrmann, R.G.,Andersson, B. (1998) EMBOJ.,17, 1577-1587.
26. Hope,A.B. (1993) Biochim. Biophys.Acta, 1143,1-22.
27. de-Huijbregts, C., Cappon.J.J., Boen-dei; G.P., Raap, J., Cast, P., Hoff, A.J.,Lugtenbw-g, J., de Croat, H.J.M. (1998) Photosynthesis: Mechanisms and Ef-fect, 2. /Ed. Garab,G./ Amsterdam:Kluwer Acad. Publ, 759-762.
28. Krause, G.H., Weis, E. (1991) Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,42,313-349.
29. Lokstein, H., Hand, H., Hoffmann, P., Woilke, P., Renger, G. (1994) J.Photochem. Photobiol. (B): Biol., 26,175-184.
30. Malik, M., Riznichenko, G.Yu.,Rubin, A.B. (1990) Biological electron transport processes. Their mathematical modeling and computer simulation. Praha—London: Akademia. 176 p.

31. Malkin, R., Niyogi, K., (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* / Eds. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L./ Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 568—628
32. Oswald, E.M., Sugai, A., Labigne, A., Wu, A.c., Fiorentini, C., Boquet, P., O'Brien, A.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3814-3818.
33. Paschenko, V.Z., Gorokhov, V.V., Grishanova, N.P., Korvatovsky, B.N., Knox, P.P., Zakharova, N.I., Rubin, A.B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1364, 361-372.
34. Pogosyan, S.I., Sivchenko, M.A., Maximov, V.N., Ostrowska, M. (1997) *Oceanologia*, 39, 163-175.
35. Ryznichenko, G.Yu., Chrabrova, E.N., Rubin, A.B. (1988) *Studia biophysica*, 126, 51-59.
36. Ryznichenko, G.Yu., Vorobjova, T.H., Chrabrova, E.N., Rubin, A.B. (1990) *Photosynthetica*, 24, 37-51.
37. Ryznichenko, G. Yu., Rubin, A.B. (2003) *Comments on Theoretical Biol.*, in press.
38. Stowell, M.H.B., McPhillips, T.M., Rees, D.C., Soltis, S.M., Abresch, E., Feher, G. (1997) *Science*, 276, 812-816.
39. Turzo, K., Laczko, G., Filus, Z., Maroti, P. (1998) *Photosynthesis: Mechanisms and Effect*, 2 / Ed. Garab, G./Amsterdam: KluwerAcad. Publ., 837-840.
40. Verier, A.V., Ohad, L., Andersson, B. (1998) *Current Opinion in Plant Biol*, 1, 217-223.
41. Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A., Grossman, A. (1998) *Plant Physiol*, 117, 129-139.
42. Young, A.J., Frank, H.A. (1996) *J. Photochem. Photobiol. (B): Biol.*, 36, 3-15.
43. Пашенко В.З., Горохов В.В., Корватовский Б.Н., Гришанова Н.П., Саркисов О.М., Ренгер Г., Рубин А.Б. (2004), *ДАН*, 399, 1-4.
44. Алехина Н.Д., Кренделева Т.Е., Полесская О.Г. (1996) *Физиология растений*, **43**, 136-148.
45. Рубин А.Б., Шинкарев В.П. *Транспорт электронов биологических системах.* (1984) М.: Наука, 319 с.
46. Shinkarev, V .P. (1998) *Photochem. Photobiol.*, **61**, 32-42.
47. Ризниченко Г.Ю., Воробьева Т.Н., Храброва Е.Н., Рубин А.Б. (1986) *Биофизика*, **31**, 793-799. Ризниченко Г.Ю., Воробьева Т.Н., Храброва Е.Н., Рубин А.Б. (1986) *Биофизика*, **31**, 793-799.

48. Yakovlev A.G., Schkuropatov A.Yu., Shuvalov A.A. (2000) FEBS Lett. 466,209-211.
49. Пашенко В.З., Гришанова Н.П., Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Рубин А.Б. (2002) Электрохимия, **38**, 103-112.
50. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Низовская Н.В., Пашенко В.З., Тимофеев К.Н, Тулбу Г.В., Хитров Ю.А. (1977) Биохимия, **42**, 1965-1972
51. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Низовская Н.В., Тулбу Г.В. (1982) Биохимия, **47**, 904-910.
52. Чемерис Ю.К., Венедиктов П.С, Рубин А.Б., (1996) Физиология растений, **43**, 833-841.
53. Антал Т.К., Кренделева Т.Е., Лауринавичене Т.В., Макарова В.В., Цыганков А.А., Сейберт М., Рубин А.Б. (2001) Доклады Академии Наук, **381**, 119-122
54. Antal T.K., Krendeleva T.E., Laurinavichene T.V., Makarova V.V., Ghirardi M.L., Rubin A.B., Tsygankov A.A., Seibert M. (2003) Biochimica et Biophysica Acta , 1607, 153-160.
55. Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S. (1995) J. Plant Physiol., 146,(5-6), 609-614.
56. Васильев С.С., Арутюнян А.А., Чемерис Ю.К., Пашенко В.З., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. (1986) Биофизика, 31,1, 27-30.
57. Matorin D.N., Venediktov P.S., Konev Yu.V., Rubin A.B. (1996) Doklady Russ. Acad. Sci., Earth Sci. Sect. 350 (7), 1159-1161.
58. Matorin D.N., Vavilin D.V., Konev Yu.N., Kazimirko Yu. V., Rubin A.B. (1997) Moscow Univ. Biol. Bull. 16 (1), 25-28.
59. Matorin D.N. (2000) Biofizika (Moscow) 45, 491-494.
60. Vavilin D.V., Vasil'ev I.R., Venediktov P.S., Izmest'eva L.R., Matorin D.N., Polynov V.A. (1993) Hydrobiol. J. (Russia), 29 (1), 3-12.
61. Погосян С.И., Маторин Д.Н., Волкова Э.В., Антал Т.К., Казимирко Ю.В., Востоков С.В., Рубин А.Б. «Использование комплекса флуориметрических методов для оценки состояния фитопланктонного сообщества моря», Сб. статей п.ред. А.Г. Зацепина, М.В. Флинта. М. Наука, (2001), 436-447.
62. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. (1990) Итоги науки и техники, Биофизика М., ВИНТИ, 40.
63. Кауров Ю.Н., Погосян С.И., Микоэлян А.С., Возняк Б., Хаптер Р.(1996) 43, 4, 629-637.
64. Венедиктов П.С., Казимирко Ю.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Погосян С.И., Яковлева О.В., Рубин А.Б. (2000) Экология, 5, 338-342.

65. Венедиктов П.С., Волгин С.Л., Казимирко Ю.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Лаврухина О.Г., Яковлева О.В., Рубин А.Б. (1999) *Биофизика*, 44, 1037-1047.
66. Pogosyan S.I., Volkova E.V., Kazimirko Yu.V., Maksimov V.N., Rubin A.B. (1998) *Doklady Akad. Nauk (DAN)* 363, 5, 690-693.
67. Falkowski P.G.(1992) Molecular ecology of phytoplankton photosynthesis. In: *Primary Production and Biogeochemical Cycles in the Sea*. P.G. Falkowski & A.D. Woodhead, (eds.), Plenum Press, NY, 47-67.
68. Rubin A.B., Venediktov P.S., Matorin D.N., Pogosyan S.I. (2004) *Oceanologia (Polish Acad. Sci)* (in press).