

УДК 577.3

## МОНИТОРИНГ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *Chlorella* ПРИ ИСТОЩЕНИИ АЗОТА В СРЕДЕ

© 2019 г. Т.Ю. Плюснина, С.С. Хрущев, А.Е. Фролов, Н.С. Дегтерева, И.В. Колюхов, С.И. Погосян, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12  
E-mail: plusn@yandex.ru*

Поступила в редакцию 22.03.2019 г.

После доработки 22.03.2019 г.

Принята к публикации 29.03.2019 г.

Представлены результаты мониторинга фотосинтетической активности культуры зеленой микроводоросли *Chlorella*, культивируемой в фотобиореакторе в трех разных средах, различающихся минеральным составом. Для проведения экспериментов был использован термофильный штамм, характеризующийся быстрым ростом. В течение 40 ч роста культуры на каждой среде с интервалом в один час регистрировались кривые индукции флуоресценции хлорофилла и спектры поглощения суспензии микроводорослей. Для анализа 120 индукционных кривых, полученных в результате мониторинга, был применен разработанный авторами метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации. Была проанализирована динамика постепенного изменения числа фаз индукционных кривых, их амплитуд и характерных времен в процессе роста культуры. Связь параметров индукционных кривых с процессами переноса электрона в реакционном центре фотосистемы II позволила дать интерпретацию изменения форм индукционных кривых по мере истощения азота в среде в терминах процессов в реакционном центре фотосистемы II. Продемонстрирована высокая чувствительность метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации и удобство его применения для анализа большого числа индукционных кривых при мониторинге роста культуры. Обсуждаются физиологические процессы, сопровождающие наступление азотного голодания.

*Ключевые слова: фотосинтез, культивирование в фотобиореакторе, истощение азота, анализ кривых индукции флуоресценции, мультиэкспоненциальная аппроксимация.*

DOI: 10.1134/S0006302919030062

В настоящее время микроводоросли рассматриваются в качестве перспективного сырья для производства биотоплива. При определенных условиях наступления экологического стресса, в частности при азотном голодании, многие микроводоросли способны накапливать богатые энергией соединения, такие как крахмал и/или липиды, которые могут быть конвертированы в биотопливо [1]. Так, в работе [2] было показано, что в первый день роста культуры микроводорослей азотное голодание вызывает накопление крахмала, в последующие дни крахмал частично разлагается и происходит накопление липидов. Механизмы регуляции метаболических путей, в которых синтезируются эти органические макромолекулы, тесно связаны с активностью фотосинтетического аппарата клетки [3,4].

Сокращение: СМЭА — спектральная мультиэкспоненциальная аппроксимация.

Для оценки активности фотосинтетического аппарата, в том числе при действии внешних факторов, традиционно применяется анализ экспериментальных кривых индукции флуоресценции хлорофилла [5]. Кривая индукции флуоресценции, построенная в логарифмическом масштабе по времени, так называемая ОКЛР-кривая, как правило, включает несколько фаз [5]. Интенсивность флуоресценции изменяется от некоего исходного уровня  $F_0$ , точки O на кривой, до максимального уровня  $F_m$  (при насыщающей интенсивности света), точки P на кривой (см., например, рис. 1а). Появление отдельных фаз K, J, I и R на кривой примерно соответствуют моментам времени 0 — 0,5 мс, 0,5 — 2,5 мс, 2,5 — 20 мс и 20 — 300 мс [5] и отражают этапы переноса электрона в фотосистеме II. По характеру фаз кривой можно судить, насколько эффективен электронный транспорт на начальных стадиях фотосинтеза. Участок кривой OJ принято называть «фото-

химической фазой» [6], которая отражает восстановление первичных акцепторов электрона — феофитина и хинона QA. Участок кривой JIP принято называть «тепловой фазой», он отражает накопление вторичного хинона QB, его амплитуда зависит от температуры [6].

Одной из важнейших характеристик эффективности фотосинтетического аппарата является квантовый выход первичных реакций фотосинтеза, вычисляемый через минимальное ( $F_0$ ) и максимальное ( $F_m$ ) значения индукционной кривой с помощью выражения  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  [7,8]. В условиях дефицита тех или иных биогенных элементов, в частности азота, происходит ряд изменений фотосинтетического аппарата, отражающихся в снижении относительной переменной флуоресценции  $F_v/F_m$  [9], что может быть обусловлено повышением значения  $F_0$  за счет нарушений в работе реакционных центров, в частности, в связи с торможением синтеза белка  $D_1$  [10] и уменьшением эффективности тушения энергии возбуждения в антенне. Изменение параметров индукционных кривых тесно коррелирует с физиологическими процессами клетки. Так, авторами работы [11] при исследовании действия азотного голодания на клетки водоросли *Chlorella* была продемонстрирована связь параметров индукционной кривой с накоплением липидов и каротиноидов, являющихся целевыми продуктами во многих биотехнологических процессах.

При нагревании образцов растительных клеток на индукционных кривых появляется дополнительная фаза (так называемая К-фаза), которую принято связывать с деактивацией кислородвыделяющего комплекса [12–16]. Появление К-фазы отображается на индукционных кривых в виде спада и, как следствие, появления локального максимума на индукционной кривой на временах ~ 300 мкс. Наблюдаемое тушение индукции флуоресценции связывают с накоплением окисленных форм пигмента реакционного центра  $P_{680}^+$  и остатка тирозина  $Tyr_Z^+$  — промежуточного переносчика электрона от кислородвыделяющего комплекса, — являющихся тушителями флуоресценции и накапливающимися в результате затруднения переноса на них электронов от кислородвыделяющего комплекса при деактивации последнего [17,18]. В работах [19–21] было показано, что К-фаза также может появиться на индукционной кривой и в условиях минерального голодания. Аналогичным образом К-фаза появляется и при выращивании культуры в условиях недостатка влаги [22,23] и в условиях повышенной концентрации солей [24–26]. Рядом авторов предлагается считать появление К-фазы

тестом на возникновение стрессовых условий [12,17,27,28].

Авторами работы [5] был разработан метод анализа индукционных кривых, JIP-тест, позволяющий оценивать эффективность электронного транспорта на разных этапах переноса электрона в электронтранспортной цепи, используя параметры индукционной кривой. Несмотря на широкое использование JIP-теста, в том числе и для мониторинга минерального голодания [11], определение параметров индукционной кривой ограничено как возможностями временного разрешения измерительных приборов, так и самим подходом, основанным на характеристике фаз индукционной кривой, привязанных к исходно заданным моментам времени.

Математические методы анализа индукционных кривых позволяют более точно выявлять их особенности. Разработанный нами метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) кривой индукции флуоресценции [29] позволяет анализировать динамику фаз — изменение характерных времен и амплитуд одновременно десятков и сотен индукционных кривых, что делает его удобным при мониторинге роста культуры клеток в фотобиореакторе, когда кривые снимаются через относительно короткие интервалы времени и составляют в конечном итоге довольно большой массив данных. Использование метода СМЭА позволяет детектировать появление визуально неразличимых фаз индукционных кривых, соответствующих увеличению вклада процессов с соответствующим этой фазе характерным временем. Использование нами метода СМЭА позволило проследить динамику фаз индукционных кривых, полученных на культуре водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, голодающей по сере. В настоящей работе была поставлена задача проанализировать динамику изменений фотосинтетического аппарата клеток микроводорослей *Chlorella* при истощении азота в среде путем анализа кривых индукции флуоресценции, регистрируемых ежечасно в процессе роста культуры в фотобиореакторе. Были использованы три среды, различающиеся по составу элементов: в первом и третьем вариантах среды — одинаковое содержание азота, но разное содержание других элементов, во втором и третьем вариантах — одинаковое содержание всех элементов, кроме азота. В задачу работы, таким образом, входил анализ различий в динамике фаз индукционных кривых в процессе роста культуры клеток микроводоросли *Chlorella* на трех разных средах и максимально раннее детектирование начала изменения фаз ин-

дукционной кривой, отражающих ответ фотосистемы II на постепенное истощение азота в среде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выращивание культуры микроводорослей *Chlorella*.** Для проведения экспериментов был использован термофильный штамм зеленой одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijerinck, характеризующийся быстрым ростом – время удвоения количества клеток может составлять 3–5 ч в зависимости от условий выращивания. Эксперименты по выращиванию микроводорослей были проведены в панельном фотобиореакторе объемом 1 л, построенном на кафедре биофизики МГУ [30]. Маточную культуру выращивали на минеральной среде Тамия [31] при 36°C, затем помещали ее в фотобиореактор. Начальная оптическая плотность культуры внутри фотобиореактора составляла 0,01 на 1 см (при длине волны 675 нм). Фотобиореактор освещали непрерывно светодиодной панелью (цветовая серия светодиодов «warm white»), интенсивность 180 мкЭ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Температуру внутри фотобиореактора поддерживали на уровне 36,0 ± 0,5°C. Фотобиореактор барботировали CO<sub>2</sub>-обогащенной воздушной смесью (0,4% CO<sub>2</sub>), распыляемой у дна сосуда. Объемная скорость подачи воздуха составляла 1 л мин<sup>-1</sup>.

Для выращивания культуры использовали три варианта среды. Первый вариант – среда Тамия с разведением 1/20 (будем называть ее богатой средой и обозначать T/20). Второй вариант – среда Тамия с разведением 1/30 (будем называть ее бедной средой и обозначать T/30). В третьем варианте среды содержалось такое же количество азота, как и в бедной среде, при этом остальных компонентов минеральной среды было столько же, сколько в богатой среде (будем называть эту среду бедной по азоту и обозначать N/30). Таким образом, среды T/30 и N/30 содержали одинаковое количество азота и разное количество всех других элементов, а среды N/30 и T/20, наоборот, содержали одинаковое количество всех элементов, кроме азота.

Разведение среды 1/30 было подобрано таким образом, чтобы к окончанию эксперимента оптическая плотность культуры в синей области спектра (455 нм) не превышала 0,5 см<sup>-1</sup>, когда можно пренебречь эффектом экранирования возбуждающего света в проточной кювете флуориметра и его влиянием на продолжительность фотохимической фазы кривой индукции флуоресценции.

**Измерение спектров поглощения и флуоресценции хлорофилла.** В процессе роста культуры водо-

рослей были определены спектры поглощения суспензии клеток и измерены кривые индукции флуоресценции хлорофилла. Все измерения проводились с частотой один раз в час при помощи автоматизированного приборного комплекса, состоящего из модуля отбора проб, оптического модуля (флуориметр + спектрофотометр) и персонального компьютера. В одном цикле измерений с помощью устройства отбора проба жидкости из фотобиореактора подается в проточную кювету оптического модуля, подача пробы на время измерений останавливается, далее проба возвращается обратно в фотобиореактор и осуществляется промывка транспортных трубок и фотометрической кюветы чистой водой.

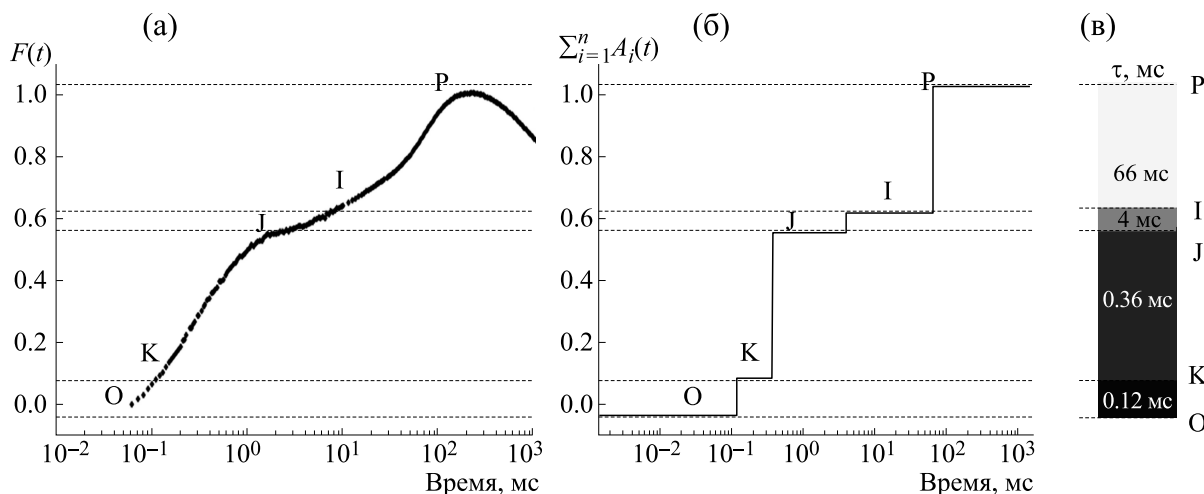
Спектрофотометр и флуориметр имеют общую проточную кювету с длиной оптического пути 2 мм. Возбуждение флуоресценции осуществляли в области 455 нм (3000 мкЭ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>), регистрацию – в области 670–750 нм (кремниевый фотодиод, светофильтры ПС-8 и КС-17). При записи индукционной кривой сигнал флуоресценции оцифровывали с интервалом 5 мкс. Продолжительность адаптации проб к темноте составляла 3 мин.

Для измерения спектров поглощения суспензии использовали спектрометр USB2000+ (Ocean Optics, США) с галогеновой лампой в качестве источника света. Содержание хлорофилла оценивали по оптической плотности с поправкой на светорассеяние как разность оптической плотности, измеренной на длинах волн 675 нм и 725 нм (A<sub>675</sub> – A<sub>725</sub>) в спектрах поглощения. Содержание каротиноидов оценивалось аналогично как разность оптической плотности, измеренной на длинах волн 470 нм и 550 нм (A<sub>470</sub> – A<sub>550</sub>).

**Метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации кривых индукции флуоресценции.** Для анализа индукционных кривых, полученных в процессе роста культуры *Chlorella* в фотобиореакторе, был использован разработанный нами метод СМЭА [29]. Кинетика индукции флуоресценции аппроксимируется в нем мультиэкспоненциальным рядом:

$$F(t) = F_0 + \sum_{n=1}^N A_n (1 - e^{-t/\tau_n}), \quad (1)$$

где  $F_0$  – минимальное значение на кривой индукции флуоресценции  $F(t)$ ,  $A_n$  отражает вклад  $n$ -й экспоненты с характерным временем  $\tau_n$  в общий сигнал,  $t$  – время. Характерные времена  $\tau_n$  экспоненциальных функций  $A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$  в уравнении (1) задаются следующим образом: выбирается начальное время  $\tau_1$ , соответствующее, как правило, первой точке на экспериментальной кривой. Далее на логарифмическом масштабе строятся касательные к кривой, и их пересечение с осью времени дает время  $\tau_2$ . Аналогично находят  $\tau_3, \dots, \tau_N$ .



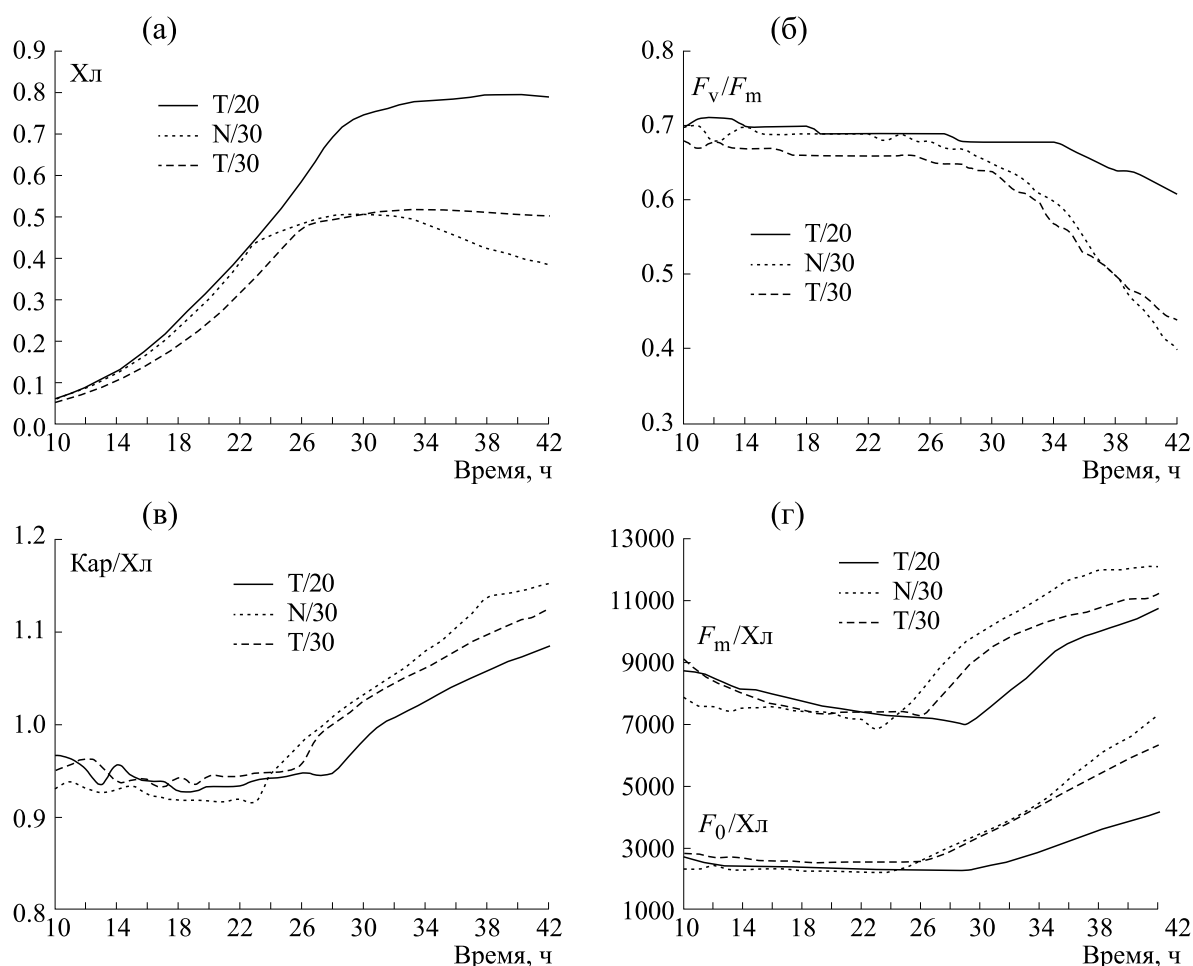
**Рис. 1.** Иллюстрация метода мультиэкспоненциальной аппроксимации применительно к типичной индукционной кривой. (а) – Индукционная кривая для микроводоросли *Chlorella*, полученная на 33-м часу роста культуры (богатая среда Т/20). (б) – Ступенчатая функция, полученная вычислением на каждом шаге сетки частичных сумм амплитуд (преобразование методом мультиэкспоненциальной аппроксимации). (в) – Визуализация фаз с помощью цвета. Изменение интенсивности цвета от черного к белому соответствует изменению характерного времени от 1 мкс до 1 с. Цвет полосы определяет характерное время соответствующей фазы, высота полосы – ее амплитуду.

рифмической шкале времени задается шаг  $k_{step}$ , последующие точки рассчитываются как  $\tau_{n+1} = k_{step} \tau_n$ , последняя точка соответствует времени, на котором достигается максимум экспериментальной кривой. Таким образом, получается ряд, содержащий до нескольких сотен экспоненциальных функций  $A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$  с заданными временами  $\tau_n$ , амплитуды  $A_n$  которого оцениваются по методу наименьших квадратов.

Результат аппроксимации экспериментальной кривой (рис. 1а) уравнением (1) представляет собой набор амплитуд  $A_n$ , соответствующих каждая своему значению времени  $\tau_n$ , выбранному на логарифмической сетке. Для визуализации этого набора на каждом шаге по времени  $\tau_n$  все полученные амплитуды  $A_n$ , соответствующие характерным временам  $\tau_i < \tau_n$ , суммируются: в точке  $\tau_1$  откладывается амплитуда  $A_1$ , в точке  $\tau_2 - (A_1 + A_2)$  и т.д., в точке  $\tau_n - \sum_{i=1}^n A_i$ , в результате получается ступенчатая функция  $\sum_{i=1}^n A_i(t)$  (рис. 1б). Таким образом, на всем временном интервале выделяются группы ненулевых амплитуд, число таких групп (число «ступенек») определяет минимальное число экспоненциальных функций, на которые может быть разложена исходная кривая. Каждая «ступенька» и соответствующая ей экспонента выделяют, таким образом, процесс или группу процессов с определенным характерным временем. Высота «ступеньки» определяет амплитуду соответствующей экспоненты и характе-

ризует относительный вклад этого процесса в индукционную кривую. Таким образом, описываемый метод выделяет группы процессов с разными характерными временами и соответствующие фазы на индукционной кривой, не всегда различаемые визуально. На примере, приведенном на рис. 1, видно, что на исходной индукционной кривой  $F(t)$  визуально выделяются только две фазы – ОJ и JP (рис. 1а), а после описанного выше преобразования становятся хорошо различимыми также фазы ОК и JI, то есть, благодаря высокой чувствительности метода, на кривой можно выделить четыре фазы и соответственно четыре группы процессов со своими характерными временами.

Для визуализации результатов анализа большого числа индукционных кривых мы использовали представление полученных ступенчатых функций в виде тепловой карты. Спектр характерных времен от 1 мкс до 1 с соответствует цветовой шкале от черного к белому. Ступенчатая функция (рис. 1б) преобразуется в разделенную на несколько частей вертикальную полосу. Цвета частей соответствуют характерным временам выделенных фаз, а высота – амплитудам этих фаз (рис. 1в). Объединение таких полос, полученных при обработке большого количества данных, в тепловую карту дает визуальное представление о динамике изменения характерных времен фаз на индукционной кривой в процессе роста культуры (см. рис. 3 в разделе «Результаты»).



**Рис. 2.** Изменение спектральных характеристик и параметров индукционной кривой в процессе роста культуры для следующих сред: Т/20 – богатая среда, Т/30 – бедная среда, N/30 – среда, бедная по азоту. (а) – Изменение количества хлорофилла (разность оптической плотности  $A_{675} - A_{725}$ ); (б) – изменение  $F_v/F_m$ ; (в) – изменение соотношения каротиноидов к хлорофиллу  $(A_{470} - A_{550})/(A_{675} - A_{725})$ ; (г) – изменение  $F_o$  и  $F_m$ , нормированных на хлорофилл.

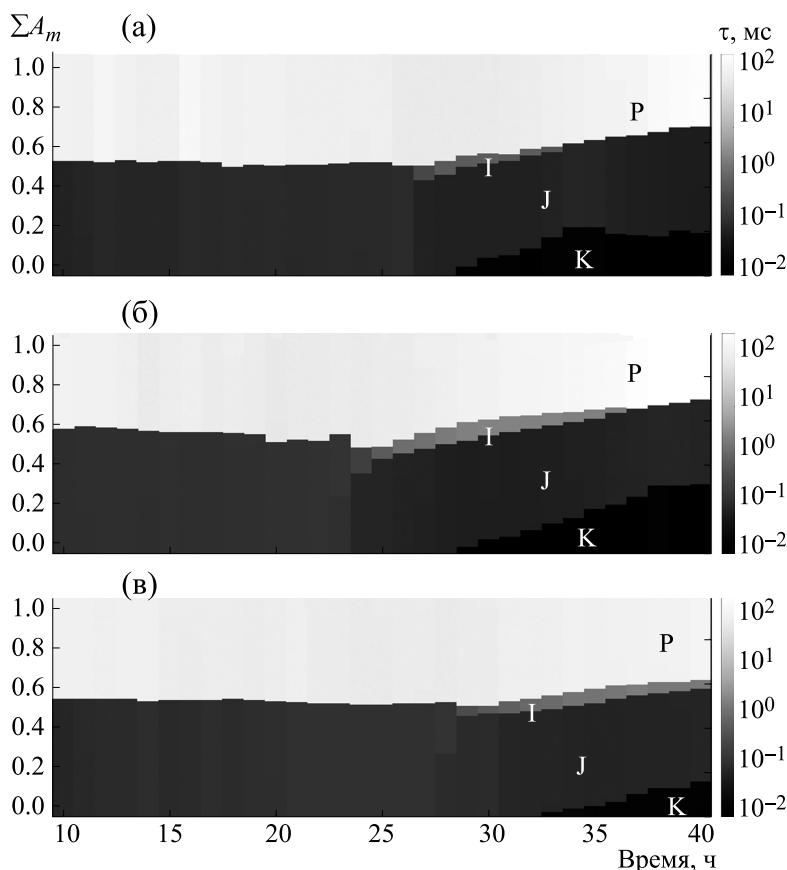
Предложенный метод анализа данных индукции флуоресценции реализован в виде пакета программ ruPhotoSyn [29], который позволяет проводить одновременный анализ нескольких сотен индукционных кривых.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения изменений фотосинтетического аппарата, в частности работы фотосистемы II, в растущих клетках микроводорослей при естественном истощении среды (выедании ее клетками микроводорослей) была проведена серия экспериментов, в которых осуществляли мониторинг изменения кривых индукции флуоресценции и спектров поглощения в клетках *Chlorella*. Исходя из предварительных данных экспериментов с растущей культурой, мы предположили, что основным фактором, лимитирующим рост

клеток в накопительной культуре, является истощение азота. Для проверки этой гипотезы ростовые эксперименты были проведены на средах разного минерального состава: Т/30 (бедная среда), N/30 (бедная по азоту среда), Т/20 (богатая среда) (см. раздел «Методы»).

Анализ спектров поглощения на каждом часу роста культуры позволил получить кривые изменения количества хлорофилла и каротиноидов в течение роста культуры для всех трех случаев, а также изменения соотношения этих пигментов в процессе роста (рис. 2а,в). Параллельно были получены зависимости от времени роста основных характеристик индукционных кривых: минимального и максимального значений –  $F_o$  и  $F_m$ , нормированных на содержание хлорофилла (рис. 2г), и квантового выхода первичных реакций переноса электронов  $F_v/F_m$  (рис. 2б). На всех

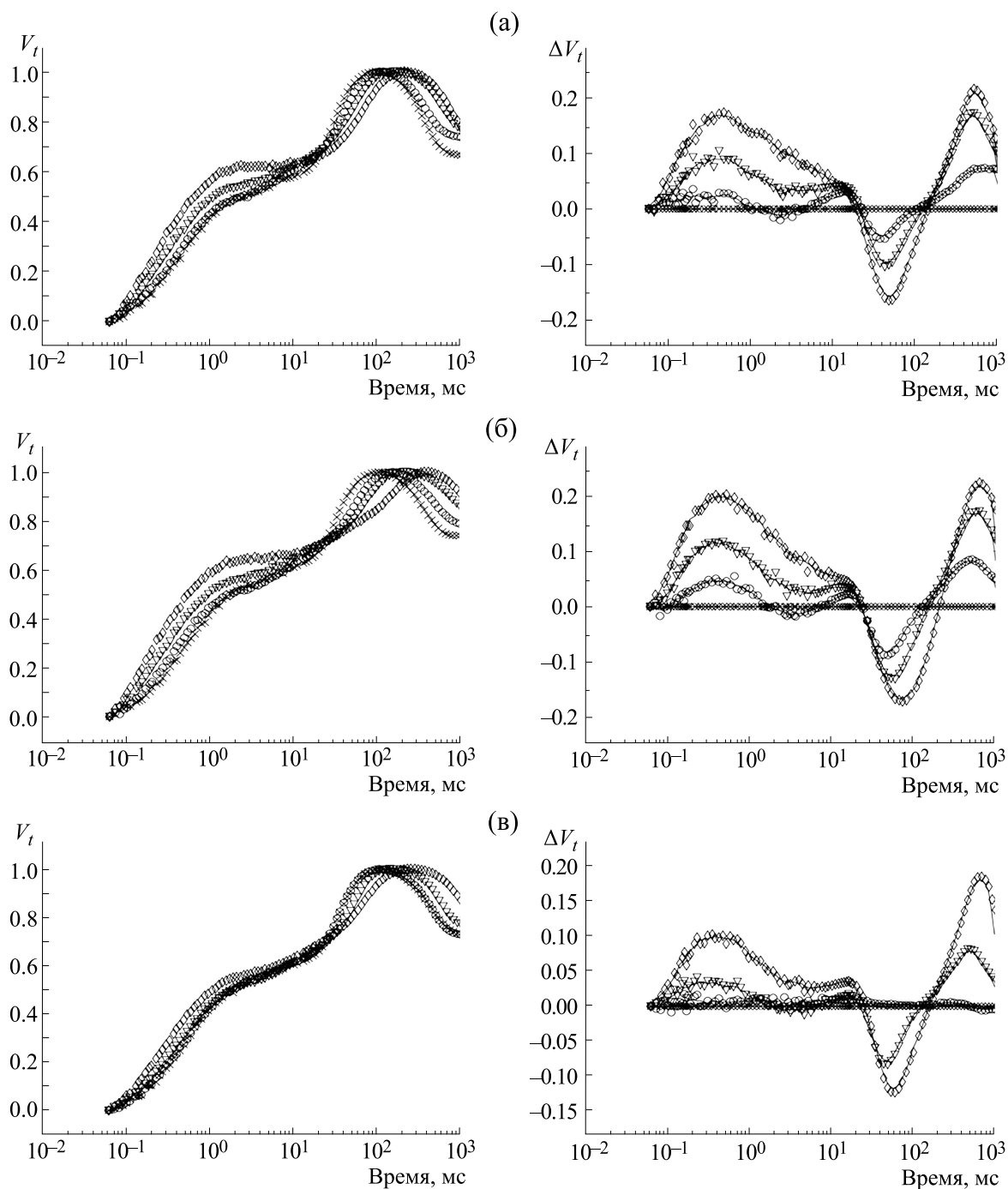


**Рис. 3.** Тепловые карты динамики изменения компонентного состава ОКJP-кривых в течение 40 ч роста культуры на бедной среде T/30 (а), на бедной по азоту среде N/30 (б), на богатой среде T/20 (в). Характерные времена К-фазы – 200–500 мкс, J-фазы – 1,5–3,0 мс, I-фазы – 30–40 мс, P-фазы – 70–100 мс.

типах кривых, за исключением  $F_v/F_m$ , можно выделить точки перегиба, соответствующие моменту времени, после которого явно меняется характер наклона кривых: для бедной среды T/30 – 26 ч, для бедной по азоту среды N/30 – 23 ч, для богатой среды T/20 – 28 ч. На начальном этапе роста культуры, до точки перегиба, наблюдается линейный рост количества хлорофилла (рис. 2а), при этом рост происходит быстрее (наклон кривых круче) в богатой среде T/20 и бедной только по азоту среде N/30. Соотношение каротиноидов и хлорофилла в этот период не меняется (рис. 2в). Значения  $F_o/Xл$  также остаются постоянными (рис. 2г, кривые в нижней части рисунка). Значения  $F_m/Xл$  (рис. 2г, кривые в верхней части рисунка) и соответственно  $F_v/F_m$  незначительно падают. После точки перегиба происходит довольно резкое замедление роста содержания хлорофилла (рис. 2а), при этом начинает меняться соотношение пигментов – количество каротиноидов по отношению к хлорофиллу начинает увеличиваться (рис. 2в). Значения  $F_o/Xл$  и  $F_m/Xл$  также начина-

ют возрастать, при этом  $F_o/Xл$  растет быстрее (рис. 2г), что приводит к падению  $F_v/F_m$  (рис. 2б). Максимальное количество хлорофилла в богатой среде T/20 превышает примерно в полтора раза максимальное количество хлорофилла на средах T/30 и N/30, которое для этих сред оказалось одинаковым. Сравнение кривых накопления хлорофилла для трех сред (рис. 2а) позволяет предположить, что фактором, лимитирующим рост культуры микроводорослей *Chlorella*, является именно содержание азота в среде. Точки перегиба на ростовых кривых соответствуют моменту, когда исчерпывается весь азот в среде.

Далее методом СМЭА были обработаны три семейства кривых индукции флуоресценции хлорофилла, измеряемых каждый час в ходе роста микроводорослей *Chlorella* в фотобиореакторе, каждое семейство кривых соответствовало трем использованным средам. На тепловых картах (рис. 3), полученных в результате преобразования индукционных кривых, четко видны четыре фазы – К, J, I, P, обозначенные в соответствии с фазами индукционной кривой.



**Рис. 4.** Нормированные на  $F_v$  кривые индукции флуоресценции –  $V_t$  (справа) и разностные кривые  $\Delta V_t$  (слева): крестики – 23-й час роста, кружки – 30-й час роста, треугольники – 35-й час роста, ромбы – 40-й час роста. (а) – Кривые для бедной среды Т/30; (б) – кривые для бедной по азоту среды N/30; (в) – кривые для богатой среды Т/20.

В первые сутки роста все индукционные кривые имеют только две фазы – J и P. Затем на индукционных кривых начинает появляться фаза I, время ее появления коррелирует с точкой перегиба на ростовых кривых (рис. 2а): 24-й час роста для бедной по азоту среды N/30, 27-й час

для бедной среды Т/30 и 30-й час для богатой среды Т/20.

Далее в процессе роста на индукционных кривых появляется К-фаза: на 29-м часу для бедной и бедной по азоту сред Т/30, N/30, на 34-м часу – для богатой среды Т/20. Характерные

времена фаз К и J на индукционных кривых для всех трех сред в ходе роста культуры укорачиваются (фазы К и J на тепловых картах на рис. 3 становятся темнее), тогда как характерные времена фаз I и P, наоборот, удлиняются (фазы I и P на тепловых картах на рис. 3 становятся светлее).

В ряде работ [17,19] для выявления К-фазы на индукционной кривой используются разностные кривые, получаемые вычитанием одних индукционных кривых из других, при этом кривые обычно нормируются на  $F_v = F_m - F_o$ . Разностные кривые используются в тех случаях, когда на исходных кривых К-фаза визуально не выделяется. Мы провели аналогичный анализ, построив нормированные на  $F_v$  кривые, полученные на 23-м, 30-м, 35-м и 40-м часу роста культуры (рис. 4, слева), и разности между этими кривыми и выбранной кривой, соответствующей 23-му часу (рис. 4, справа). Характерное время первого максимума на разностных кривых, соответствующего К-фазе, находится примерно на 450 мкс, что согласуется с характерным временем К-фазы, определенным по тепловым картам (рис. 3). Видно, что для бедной среды Т/30 и бедной по азоту среды N/30 на 30-м часу роста этот максимум на разностных кривых уже хорошо выражен (рис. 4а,б), тогда как для богатой среды Т/20 (рис. 4в) на 30-м часу его еще нет, что указывает на более позднее начало деградации кислородвыделяющего комплекса.

Результаты анализа индукционных кривых обоими методами — спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации и с помощью разностных кривых — согласуются друг с другом и выявляют дополнительные, визуально неразличимые фазы на индукционных кривых.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ кривых индукции флуоресценции, полученных в процессе роста культуры микроводорослей *Chlorella* в фотобиореакторе на средах с различным содержанием микроэлементов, показал, что индукционные кривые могут служить довольно чувствительным маркером процессов в фотосинтетическом аппарате, развивающихся по мере истощения элементов среды. Сравнение содержания хлорофилла в клетках, растущих на разных по элементному составу средах, показывает, что для микроводорослей *Chlorella* именно нехватка азота является фактором, определяющим начало голодания, которое сопровождается замедлением роста количества хлорофилла (рис. 2а), увеличением относительной доли каротиноидов (рис. 2в), снижением актив-

ности фотосинтетического аппарата (рис. 2б). Наблюдаемое увеличение относительной доли каротиноидов (рис. 2в) объясняется тем, что при недостатке азота в среде скорость синтеза хлорофилла снижается быстрее, чем скорость синтеза каротиноидов. Рост значений  $F_o/Xл$  и  $F_m/Xл$  (рис. 2г) после точки перегиба может быть связан с накоплением поврежденных форм реакционных центров, дающих дополнительный вклад в индукцию флуоресценции. Однако скорость роста  $F_o/Xл$  выше, чем скорость увеличения  $F_m/Xл$ , что может объясняться частичным восстановлением реакционных центров в темноте за счет усиления так называемого хлородыхания, при котором происходит перенос электронов на пул пластохинона от молекул NADH, накапливающихся в процессе гликолиза. Известно, что в условиях серного голодания инактивация фотосистемы II и параллельное накопление крахмала приводят к усилению хлородыхания, что вызывает увеличение степени восстановленности пула пластохинона [32–34]. Активация хлородыхания при истощении азота в среде также весьма вероятна, поскольку в условиях азотного голодания, как и в условиях серного голодания, происходит накопление крахмала [34,35], далее — активация гликолиза, накопление NADH и последующий перенос электронов в пул пластохинона, что и приводит к возрастанию  $F_o$ .

Разработанный нами метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации кривой индукции флуоресценции [29] позволил проанализировать динамику фаз индукционной кривой в процессе роста культуры, проследить изменение количества фаз, их амплитуд и характерных времен.

Анализ индукционных кривых показал, что в процессе роста культуры наблюдается уменьшение характерного времени J-фазы (рис. 3), что, как правило, связывают с увеличением эффективного сечения антенны реакционных центров фотосистемы II. В связи с нарушением синтеза белка и хлорофилла в результате истощения азота в среде происходит инактивация части реакционных центров, однако за счет наличия общей для нескольких реакционных центров антенны может происходить увеличение потока энергии на оставшиеся активные реакционные центры фотосистемы II, что и объясняет увеличение эффективного сечения антенны.

Анализ индукционных кривых (рис. 3) в сравнении с кривыми изменения содержания хлорофилла (рис. 2а) показывает, что точка перегиба на кривых роста хлорофилла совпадает по времени с моментом появления I-фазы. Данная фаза у клеток, выращенных на бедной среде, появляется раньше (27-й час), чем у клеток, выращенных на богатой среде (29-й час). Поскольку содержание хлорофилла перестает увеличиваться, можно



предположить, что к этому моменту азот в среде исчерпан. На связь дефицита азота в среде и появления I-фазы на индукционной кривой указывали авторы работы [11]. Считается, что I-фаза индукционной кривой связана с восстановлением пула подвижного пластохинона PQH<sub>2</sub> [19]. Можно предположить, что на начальных стадиях роста культуры пул пластохинонов после темновой адаптации находится преимущественно в окисленном состоянии. При освещении степень восстановленности пула начинает увеличиваться, так как поток электронов в пул от фотосистемы II превышает поток электронов из пула к фотосистеме I через цитохромный комплекс. Активация темновых стадий фотосинтеза, принимающих электроны на акцепторной стороне фотосистемы I, снова приводит к уменьшению восстановленности пула хинонов, причем это реокисление происходит достаточно быстро, чтобы не препятствовать потоку электронов от фотосистемы II, и I-фаза на кривой индукции флуоресценции не проявляется. Появление I-фазы на начальном этапе голодания можно связать с увеличением восстановленности пула пластохинона в темноте, что может быть обусловлено усилением хлородыхания и коррелирует с описанным увеличением  $F_0$  (рис. 2г).

Изменения электронного транспорта на донорной стороне фотосистемы II принято связывать с K-фазой [12,17,27,28,36]. Как указывалось выше, появление K-фазы (рис. 3 и 4) и увеличение ее амплитуды может быть вызвано деактивацией кислородвыделяющего комплекса. Это соответствует экспериментальным данным [36] и предположениям, сделанным в этой же работе о том, что рост амплитуды данной фазы связан с уменьшением запаса нитратов в среде. Сравнение динамики фаз индукционных кривых (рис. 3) с изменением квантового выхода  $F_v/F_m$  (рис. 2б) показало, что начало уменьшения квантового выхода первичных процессов фотосинтеза коррелирует с появлением K-фазы. Дальнейшее увеличение амплитуды K-фазы происходит одновременно с уменьшением квантового выхода первичных процессов фотосинтеза.

Обобщая вышесказанное, можно предложить следующую последовательность событий в процессе роста культуры при истощении среды. Постепенное выедание растущей культурой компонентов среды и начало голодания вызывает стресс, одним из результатов которого является накопление крахмала, что в свою очередь приводит к активации гликолиза и усилению хлоропластного дыхания. В результате усиления хлоропластного дыхания происходит увеличение пула восстановленного пластохинона, что отражается в увеличении  $F_0$  и появлении I-фазы на индукци-

онной кривой. Начало увеличения величины  $F_0/Xл$  связано с полным истощением азота в среде. При этом показатель активности фотосистемы II  $F_v/F_m$  к этому моменту почти не меняется, клетка все еще «чувствует себя хорошо» — на данном этапе стресс еще не приводит к заметному нарушению первичных процессов фотосинтеза (но проявляется в других аспектах клеточного метаболизма) за счет накопленного внутриклеточного азота. В процессе дальнейшего роста возникает дефицит азота уже в самой клетке, что приводит к началу инактивации кислородвыделяющего комплекса и, как следствие, появлению K-фазы на индукционной кривой. Дальнейшая деградация кислородвыделяющего комплекса сопровождается снижением  $F_v/F_m$ , указывающим на общее снижение фотосинтетической активности. При этом происходит постепенное уменьшение I-фазы, что может объясняться уменьшением потока электронов от фотосистемы II и, как следствие, уменьшением восстановленности пула пластохинона.

Несмотря на то что однозначную трактовку изменения фаз индукционной кривой под действием различных факторов стресса, в частности азотного голодания, на данном этапе исследований провести затруднительно, возможность анализировать большой массив индукционных кривых методом СМЭА открывает перспективу для дальнейшего изучения динамики переходных процессов при минеральном голодании и действии других факторов стресса. Параллельные дополнительные измерения состава среды и клеточных компонентов, например крахмала, липидов, каротиноидов, позволили бы с большей определенностью соотносить фазы индукционных кривых с физиологическими процессами клетки и использовать эту информацию в дальнейшем для проведения экспресс-анализа изменения состояния клетки под действием стресса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Pruvost, G. Van Vooren, Le Gouic, et al., *Bioresource Technol.* **102**, 150 (2011).
2. S. Zhu, W. Huang, J. Xu, et al., *Bioresource Technol.* **152**, 292 (2014).
3. Y. Kuei-Ling, Jo-Shu Chang, *Biotechnol. J.* **6**, **1358** (2011).
4. A. Melis and T. Happe, *Plant Physiol.* **127** (3), **740** (2001).
5. B. J. Strasser and R. J. Strasser, In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Ed. by Mathis (Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1995), Vol. V, pp. 977–980.
6. A. Stirbet, G. Yu. Riznichenko, A. B. Rubin, et al., *Biochemistry-Moscow* **79**, 291 (2014).
7. B. Genty, J.-M. Briantais, and N. R. Baker, *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 87 (1989).

8. M. Obata, T. Toda, and S. Taguchi, *J. Appl Phycol.* **21**, 315 (2009).
9. С. И. Погосян, Г. В. Лебедева и Г. Ю. Ризниченко, в сб. *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем* (Гидрометиздат, Ленинград, 1991), т. 13, сс. 280–297.
10. J. Barber, *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 269 (1998).
11. A. Solovchenko, O. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, et al., *Algal Res.* **2**, 175 (2013).
12. A. Srivastava, B. Guisse, H. Greppin, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 95 (1997).
13. S. Z. Tóth, G. Schansker, J. Kissimon, et al., *Plant Physiol.* **162**, 181 (2005).
14. S. Mathur, S. I. Allakhverdiew, A. Jajoo, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 22 (2011).
15. K. Chen, L. Chen, J. Fan, et al., *Photosynth. Res.* **116**, 21 (2013).
16. S. Chen, J. Yang, M. Zhang, et al., *Environ. Exp. Bot.* **122**, 126 (2015).
17. B. J. Strasser, *Photosynth. Res.* **52**, 147 (1997).
18. J. Essemine, S. Govindachary, S. Ammar, et al., *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 235 (2011).
19. H. M. Kalaji, A. Oukarroum, V. Alexandrov, et al., *Plant Physiol. Biochem.* **81**, 16 (2014).
20. Zh.-H. Lin, L.-S. Chen, R.-B. Chen, et al., *BMC Plant Biol.* **43**, 1 (2009).
21. S. B. Schmidt, M. Powikrowska, K. S. Krogholm, et al., *Frontiers Plant Sci.* **1772**, (2016).
22. A. Oukarroum, G. Schansker, and R. J. Strasser, *Plant Physiol.* **137**, 188 (2009).
23. A. Oukarroum, S. E. Madidi, G. Schansker, et al., *Environ. Exp. Bot.* **60**, 438 (2007).
24. S. Susplugas, A. Srivastava, and R. J. Strasser, *Plant Physiol.* **157**, 503 (2000).
25. X. Li and L. Zhang, *J. Hazard. Mater.* **295**, 79 (2015).
26. S. Mathur, P. Mehta, and A. Jajoo, *Physiol. Mol. Biol. Plants* **19** (2), 179 (2013).
27. B. Guisse, A. Srivastava, and R. J. Strasser, In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Ed. by Mathis (Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1995), Vol. V, pp. 913–916.
28. B. Guisse, A. Srivastava, and R. J. Strasser, *Arch. Sci. Geneve* **48**, 147 (1995b).
29. Т. Ю. Плюснина, С. С. Хрушев, Г. Ю. Ризниченко и др., *Биофизика* **60** (3), 487 (2015).
30. I. V. Konyukhov, In *Abstr. Book of International Scientific Conference "Physiology and biotechnology of oxygenic photoautotrophic microorganisms: looking into the future"* (Moscow, Russia 2014).
31. Е. Д. Кузнецов и М. Г. Владимирова, *Физиология растений* **11** (4), 615 (1964).
32. S. Kosourov, A. Tsygankov, M. Seibert, et al., *Biotechnol. Bioeng.* **78**, 731 (2002).
33. L. Zhang, T. Happe, and A. Melis, *Planta* **214** (4), 552 (2002).
34. G. Mouille, M. L. Maddelein, N. Libessart, et al., *Plant Cell* **8**, 1353 (1996).
35. R. Sager and S. Granick, *Gen. Physiol.* **37**, 729 (1954).
36. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, In *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Kluwer Acad. Publs., Netherlands, 2004), pp. 321–362.

## Monitoring of the Photosynthetic Activity of the *Chlorella* Microalgae Culture under Nitrogen Depletion Conditions

T.Yu. Plyusnina, S.S. Khrushchev, A.E. Frolov, N.S. Degtereva, I.V. Konyukhov,  
S.I. Pogosyan, G.Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin

*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

The paper presents the results of monitoring of the photosynthetic activity of the green microalgae *Chlorella*. A thermophilic strain of *Chlorella* with a high rate of cell division was cultivated in a photobioreactor. Three variants of nutrient medium with different mineral composition were used. Chlorophyll fluorescence induction curves and absorption spectra of microalgae suspensions were recorded every hour for 40 hours of culture growth on each medium. The method of spectral multiexponential approximation developed by the authors was used to analyze 120 induction curves obtained as a result of monitoring. This method revealed the dynamics of a gradual changes in the number of phases of induction curves, their amplitudes and characteristic times during the growth of culture. The relationship between the parameters of induction curves and electron transfer processes in the reaction center of photosystem II allowed us to interpret the changes in the shape of the induction curves in terms of the processes in the reaction center of photosystem II. The spectral multiexponential approximation method was shown to be highly sensitive to physiological state of microalgae and convenient for analyzing a huge amount of experimental data. The physiological processes accompanying the depletion of nitrogen in the environment are discussed.

*Keywords: photosynthesis, cultivation in a photobioreactor, nitrogen depletion, analysis of fluorescence induction curves, multiexponential approximation*