

ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ В ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАНАХ ВОДОРОСЛЕЙ *in vivo*, ИЗУЧАЕМАЯ В МОДЕЛЯХ ФОТОСИСТЕМЫ II И ТИЛАКОИДА ПО ИЗМЕРЕНИЯМ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

© 2022 г. Н.Е. Беляева^{*,#}, А.А. Бульчев^{*}, В.З. Пашенко^{*}, К.Е. Клементьев^{**}, П.А. Ермаченко^{***}, И.В. Конюхов^{*}, Г.Ю. Ризниченко^{*}, А.Б. Рубин^{*}

^{*}Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

[#]E-mail: natalmurav@yandex.ru

^{**}Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Шэньчжэнь, 518172, Китай

^{***}ООО «Новые трубные технологии», ул. Щепкина, 51/4, стр. 1, Москва, 129110, Россия

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

На клетках микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*) детектировали OJIPSMТ-паттерн сигнала индукции флуоресценции хлорофилла *a* при плотности потока квантов 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. на временах от микросекунд до 10 мин после темновой адаптации. Количественное описание быстрых и, частично, медленных OJIP(S)MТ-стадий индукции флуоресценции до 100 с обеспечено фитированием модели тилакоидной мембраны при достижении в расчетах адекватной динамики редокс превращений катион-радикала P700⁺. Величины параметров процессов тилакоидной мембраны найдены в решениях совместно с расчетом траекторий переменных модели тилакоидной мембраны. Динамические стадии восстановления/окисления реакционных центров фотосистемы II, пула хинонов PQ/PQH₂, комплекса Сyt *bf* и P700 реакционных центров фотосистемы I сопутствуют адаптации системы тилакоидной мембраны к свету. Анализ *in silico* показал роль комплекса Сyt *bf* в регуляции потоков электронов, когда гемы b_{L/H} в интервале 100 мс < *t* < 3 с более восстановлены при высокой освещенности, чем при умеренной. Впервые выявлена зависимость констант скоростей *k*₄₂₋₄₉ рекомбинации разделенных зарядов Phe⁻P680⁺ и Q_A⁻P680⁺ от уровня восстановления Q_B⁽²⁾⁻ вместе с зависимостью *k*₄₂₋₄₉ от освещенности хлоропластов. Задание динамических констант скоростей *k*_{FNR(t)} и *k*_{D-qE(t)} позволило сопоставить генерацию ΔpH_{o-i}(*t*) = pH_S(*t*) – pH_L(*t*), инициацию qE-тушения при pH_{L,trigger} = 6.7, активацию на свету FNR-редуктазы и достижение стационарных уровней потоков зарядов до одной-двух минут световой индукции. Фитирование модели изолированной фотосистемы II по сигналам индукции флуоресценции фитопланктона выявило близость величин параметров переноса электронов в реакционных центрах фотосистемы II у монокультур *Scenedesmus*, *Chlorella* и проб фитопланктона за исключением параметров-маркеров состояния фитопланктона: при деградации водоема в сравнении с экологически полноценным. Отличия маркеров состоят в уменьшении размеров антенн, усилении в них диссипации энергии, снижении рН люмена.

Ключевые слова: фотосистемы II и I, индукция флуоресценции хлорофилла *a*, модельные расчеты, транспорт электронов и протонов, нефотохимическое тушение.

DOI: 10.31857/S0006302922050052, EDN: JIEDQF

Детальное изучение процессов окислительного фотосинтеза в тилакоидных мембранах проводится на клетках водорослей [1, 2] и цианобакте-

рий [3], в том числе и с применением модельных исследований [1–7]. Результаты анализа фотосинтетического аппарата микроводорослей в лабораторных условиях могут применяться в иссле-

Сокращения: ТМ – тилакоидные мембраны, ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, Сyt *bf* – цитохромный *b_f*-комплекс, ФЛ – флуоресценция, РЦ – реакционный центр, Q_A и Q_B – первичный и вторичный хиноновые акцепторы фотосистемы II, PQ – пластохинон, PQH₂ – пластохинол, Phe – феофитин, КВК – кислородовыделяющий комплекс, Chl, Хл *a* – хлорофиллы антенны и РЦ, ЭТЦ – электронно-транспортная цепь, P680 – хлорофилл реакционного центра фотосистемы II, ИФ – индукция флуоресценции, *F*₀ и *F*_m – минимальный и максимальный выход флуоресценции, ЛПЭ – линейный перенос электронов, ЦПЭ – циклический перенос электронов, PFD – плотность потока квантов света.

дованиях природных сообществ фитопланктонных организмов (фитоценозов) [8]. Вместе с тем для изучения природы устойчивости сложных биологических систем [9] важны результаты анализа динамики трансформации энергии квантов света в тилакоидных мембранах.

Перенос фотосинтезирующего образца из темноты на свет индуцирует в системе тилакоидных мембран (ТМ) процессы, переходящие в стационарное состояние в течение десятков микросекунд–сотен секунд [5, 6, 10]. В исследованиях фотосинтезирующих образцов проводятся измерения кинетики индукции флуоресценции хлорофилла в пигмент-белковых комплексах тилакоидных мембран. Сведения, полученные в эксперименте и в компьютерном моделировании (*in silico*), касаются аспектов регуляции процессов системы ТМ [5–7]. Совокупность процессов переноса электронов в переходах «темнота – свет» обладает свойством саморегуляции [9], приводящей к согласованному во времени перераспределению зарядов в редокс-кофакторах фотосистем I и II (ФС I и ФС II) и цитохромного *b₆f*-комплекса (Cyt *b₆f*).

Захват квантов света и трансформация энергии электронного возбуждения в антенных системах хлорофилла сопровождается тепловыми (диссипативными) потерями энергии и излучением флуоресценции (ФЛ). Известно, что характерные сигналы флуоресценции [1–7, 10–14] обусловлены состоянием реакционных центров (РЦ) ФС II и ФС I, а также состоянием тилакоидных мембран. Использование математических моделей [1–4, 10–20] позволяет провести количественный анализ динамики процессов, ответственных за формирование сигналов флуоресценции при разных режимах светового возбуждения.

Так, в работах [11–13] по сигналам затухания ФЛ после действия импульса света длительностью в пико- или микросекунды с помощью «малых» моделей, включающих только быстрые реакции первичного преобразования энергии света в РЦ ФС II, были определены численные значения параметров процессов возбуждения антенн, разделения и рекомбинации зарядов в РЦ ФС II, стабилизации электрона на первичном хиноне Q_A^- и переноса электрона $Q_A^- \leftrightarrow Q_B^{(-)}$ на вторичный хинон. Объединение в одной модели процессов переноса зарядов на донорной и акцепторной сторонах ФС II привело к первым разработкам кинетических моделей ФС II [16–18, 20], отражающих восстановление подвижных молекул пула хинонов/хинолов (PQ/PQH₂) в стромальном Q_B -сайте ФС II. Результаты моделирования [17–20] быстрых O-J-I-P-стадий индукции флуоресценции (ИФ) на постоянном свете качественно соот-

ветствовали измерениям ИФ [7, 14] в диапазоне времени до $t < 1-2$ с.

Известные в литературе данные, по O-J-I-P-стадиям нарастания флуоресценции в условиях высокой интенсивности света, послужили основой для формирования JIP-теста [7, 21–23]. Амплитуды отдельных O-J-I-P-стадий нарастания ИФ связаны с потоками энергии в комплексах ФС II при трансформации экситонного возбуждения антенн в поток электронов с образованием молекул PQH₂. С помощью JIP-теста выявляются более подробные характеристики образцов по сравнению с методом измерения параметров – минимальной (F_0), максимальной (F_m) интенсивностей сигналов быстрой ИФ. Результаты JIP-теста можно также связать с размерами светособирающих антенн и количеством открытых РЦ ФС II.

В то же время кинетические модели, основанные на дифференциальных уравнениях [1–4, 15–20, 24–37], дают выражения для скоростей процессов транспорта электронов.

Разработанные нами кинетические модели ФС II и тилакоидной мембраны (модель тилакоида) основаны на следующих принципах.

1. Адекватность модели и исследуемого объекта, обеспечивается фитированием результатов модельных вычислений [1–3, 20, 24, 25, 31–34] до достижения их оптимального совпадения с данными по ИФ и редокс-превращениям кофактора P700 ФС I [38–40].

2. Количественное описание энергизации мембраны основано на моделировании процессов переноса электронов (e^-) и протонов (H^+) в мембранах тилакоидов.

В общей модели тилакоида [20, 24–30] выявлялась взаимосвязь компонент трансмембранного электрохимического потенциала протонов ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$): концентраций протонов ($pH_L(t)$ – люмена, $pH_S(t)$ – стромы) и величины электрического потенциала $\Delta\Psi(t)$. Количественный анализ сигналов флуоресценции проводили в кинетических моделях фотосистемы II и тилакоида на постоянном свете [3, 20, 24–30, 32] и при воздействии световых импульсов [1, 2, 31, 33, 34]. Детальную модель тилакоидной мембраны фитировали по сигналам ИФ и P700 листа гороха до $t < 10-30$ с [24, 25], определив параметры энергетического qE-тушения в антенне РЦ ФС II и активации FNR на стромальной стороне ФС I.

В разработанной нами модели тилакоидной мембраны цианобактерий [3] учитывалось влияние qE-тушения и активации FNR, кроме того, моделировались переходы состояний 2→1 и 1→2 (State Transitions $qT_{2\rightarrow 1}$ и $qT_{1\rightarrow 2}$), регулирующие распределение энергии возбуждения между ФС II

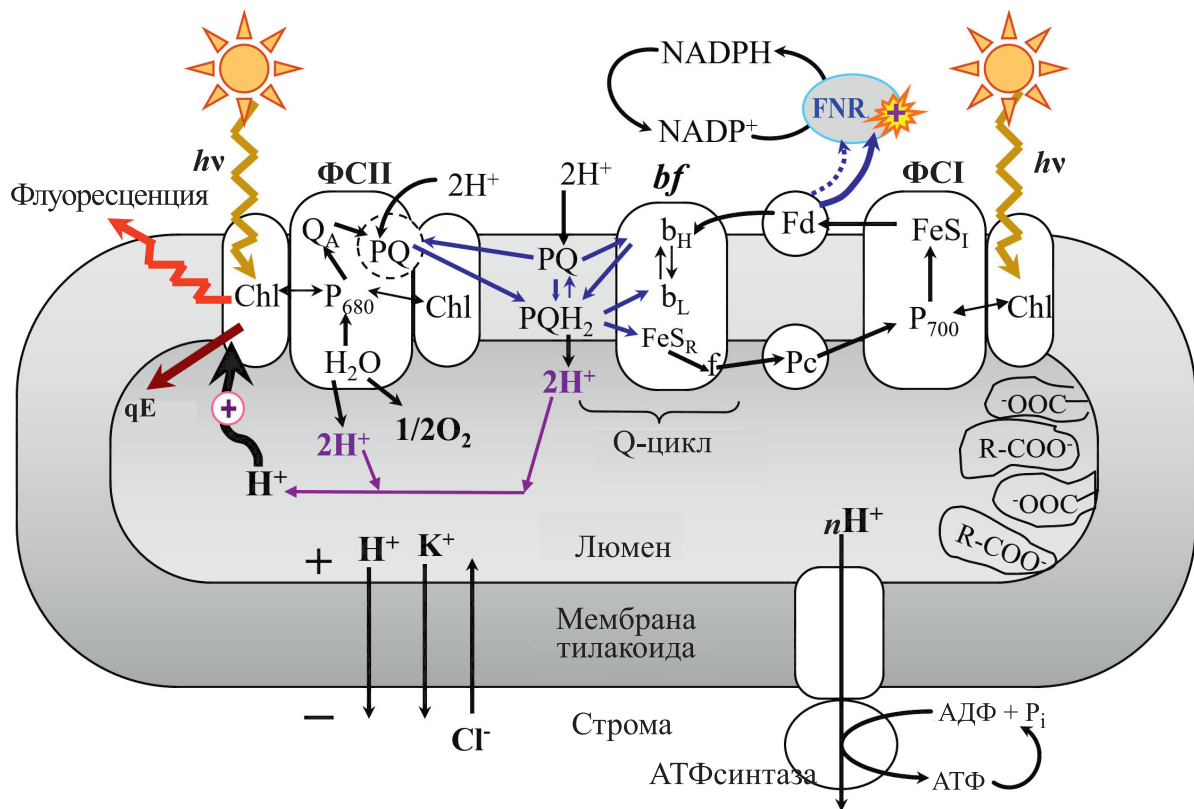


Рис. 1. Общая схема первичных процессов фотосинтеза: ФСИ, ФСII – фотосистемы I и II, *bf* – цитохромный *bf* комплекс, Chl – хлорофилл антенны, P₆₈₀ и P₇₀₀ – пигменты реакционных центров ФСII и ФСИ, Q_A – первичный хиноновый акцептор электронов, b_L и b_H – низко- и высокопотенциальный гемы *bf*, FeS_R – железосерный центр Риска, *f* – цитохром *f*, FeS_I – акцепторный комплекс ФСИ, PQ – пластохинон; PQH₂ – пластохинол; Fd – ферредоксин, Pс – пластоцианин. FNR – Fd-NADP-редуктаза. R-COO⁻ – буферные группы. Зигзагообразные стрелки обозначают кванты света и флуоресценции. Тонкими стрелками показан перенос электронов по цепи электронного транспорта и потоки ионов H⁺, K⁺ и Cl⁻ через тилакоидную мембрану после включения освещения. Изогнутая стрелка со знаком «+» – запуск qE-тушения при закислении люмена.

и ФСИ [6, 35, 36, 41–45]. В результате модельные траектории [3] воспроизводили опытные кривые ИФ, детектируемые до 5 мин на клетках *Synechocystis* sp. PCC6803.

Для изучения состояния фотосинтетического аппарата с учетом процессов фиксации CO₂ необходим переход от измерений ИФ в интервале $t < 1-2$ с к детекции сигналов ИФ до минут [22, 36]. Известны модельные исследования измерений ИФ на интервале 5–10 мин [36, 37].

При освещении образца в течение 5–10 мин выявляются отличия ОИПСМТ-паттернов ИФ [41] клеток цианобактерий в сравнении с паттернами хлоропластов водорослей и листьев. Для хлоропластов характерен ОИПСМТ-паттерн ИФ, когда наблюдаются стадии быстрого ОИП–нарастания ($t < 1$ с) и медленного PSMT-спада с переходом через промежуточное SM-нарастание (или плечо) перед достижением стационарного состояния на временах от десятков секунд до минут. На клетках водоросли *Chlamydomonas rein-*

hardtii ОИПСМТ-кинетику ИФ детектировали [43] в интервале времени до 5 мин, причем фаза SM-возрастания флуоресценции до вторичного максимума «М» объяснялась переходом $qT_{2 \rightarrow 1}$ на временах 2–5 мин [43].

В работе Стирбета и Говинджи (2016) [36] для анализа данных по измерениям ИФ *Chlamydomonas* [43] была применена модель из работы [35]. В этой модели при описании процессов тилакоидных мембран в стационарном состоянии учитывали переходы состояний фотосинтетического аппарата и восстановления стромальных пулов Fd и NADPH, причем редуцированное описание процессов ФСII содержало четыре редокс-состояния РЦ ФСII. Оказалось, что полученные в работе [36] модельные кривые воспроизводили ОИПСМТ-паттерн ИФ только качественно. Очевидно, в анализе ОИПСМТ-паттерна ИФ необходимо применить модель процессов тилакоидной мембраны с детальным, а не редуцированным описанием процессов ФСII.

В настоящей работе мы поставили задачу исследования динамики индукционных процессов в фотосинтезирующей мембране тилакоида (рис. 1) в интервале времени от десятков микро-секунд до минут на основе модели [25].

Нашей целью было моделирование ОJIPSM-паттернов ИФ клеток *Scenedesmus obliquus* (далее *Scenedesmus*), полученных в данной работе при плотности потока квантов 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (свет умеренной и высокой интенсивности) в интервале времени до 10 мин. Фитирование модели ТМ (рис. 1–4) по измерениям ИФ *Scenedesmus* проводили на временах до 100 с, не учитывая роль State transition в кинетике ИФ, но с учетом qE-тушения и активации FNR-редуктазы. Задачу нахождения параметров модели ТМ решали путем фитирования по наборам данных ИФ, детектируемой в различных условиях эксперимента — две интенсивности освещения *Scenedesmus* или две стадии роста культуры *Chlorella* в фотобиореакторе.

Модель изолированной фотосистемы II применяли при обработке измерений ИФ проб фитопланктона, позволяя получить параметры реакций РЦ ФСII в качестве характеристик-маркеров фитоценозов природных водоемов.

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Условия выращивания клеток водорослей для измерений флуоресценции. Клетки микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (далее *Scenedesmus*) культивировали в среде BG11 при значении pH приготовленной среды, равном 7.4 [46]. Культивирование происходило на качалке в люминостате при температуре 21 °С в режиме освещения при интенсивности света 70 мкмоль квантов/(м²·с) (мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹). Достижение стационарной фазы контролировали спектрофотометрически по содержанию хлорофилла. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла клеток *Scenedesmus* регистрировали на импульсном портативном флуориметре модели PSI 3000S (Photon System Instruments, Чехия), λ_{max} = 630 нм. Быструю флуоресценцию детектировали для двух интенсивностей актиничного света — 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹, равных 40 и 60% от максимальной плотности фотонного потока (3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹). Измерения проводили после адаптации клеток *Scenedesmus* к темноте в течение 10 мин при длительности освещения 600 с.

Культивирование в фотобиореакторе клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* (далее *Chlorella*) проводили в режиме постоянного освещения. Интенсивность освещения в культиваторе составляла 40 Вт/м² (белые светодиоды). Пробы из

биореактора отбирали через 3, 26 и 48 ч от начала культивирования, затем измеряли индукционные кривые флуоресценции клеток *Chlorella*. Интенсивность освещения при записи индукционной кривой составила 400 Вт/м² или 2000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (синий светодиод, 470 нм) [47].

Протокол измерений флуоресценции для фитоценоза природного водоема. В бассейне р. Темерник (Ростов-на-Дону) модельный водоем, средний в каскаде трех проточных прудов, в течение 10 лет ежегодно осенью осушался, а весной переводился в режим заливного луга в процессе летования, что способствовало активным процессам самоочищения и оздоровлению популяции гидробионтов. Исследование фитоценозов каскада верхнего, среднего и нижнего прудов (№№ 1, 2, 3) проведено путем анализа индукции флуоресценции, измеренной на пробах фитопланктона прудов: № 1 — в состоянии биологической деградации, № 2 — после «летования» с высокой биопродуктивностью (контроль) и № 3 — пруд с цветущей водой.

Пробы отбирали 30.05.2017 г. утром в 10.30–11.00 у дамб водохранилищ с глубины 0.3 м от поверхности. В течение двух часов пробы транспортировали в темной однолитровой таре до лаборатории. Для каждой пробы центрифугировали 6 пробирок по 90 г при 4000 об/мин в течение 5 мин. Сконцентрированный осадок в объеме 10 мл отбирали для измерений флуоресценции. Пробу ставили на яркий свет, а перед измерениями флуоресценции — на 5 мин в темноту. С помощью портативного флуорометра на интервале до 1 с измеряли ход кривых ИФ, вызываемых светом 4500 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹.

Структура модели тилакоидной мембраны. Структурная схема тилакоидной мембраны хлоропласта иллюстрирует на рис. 1 построение обобщенной модели тилакоида [3, 23–25, 30]. Комплексы антенн, ФСII, ФСI, Cyt *bf* встроены в мембраны и связаны потоками в люмене, мембране, строме, образуя подсистемы общей структуры ТМ. Примеры изучения отдельных подсистем известны и получены при описании частично замкнутого набора процессов ФСII [1, 2, 30–34], ФСI [48], Cyt *bf* [49].

Модель каталитического цикла фотосистемы II. Модель ФСII объединяет 30 компонент пигмент-белкового мембранного комплекса ФСII (рис. 3, 4). Захват фотона в антенне и перенос экситона в фотоактивный кластер P680 ведут к восстановлению феофитина (Phe) вместе с генерацией катион-радикала P680⁺. Высоко-положительный редокс-потенциал P680⁺ обеспечивает на входе системы РЦ ФСII срабатывание S_{0,1,2,3(4)}-циклов кислородовыделяющего комплекса (КВК) с подачей четырех электронов от молекулы воды на

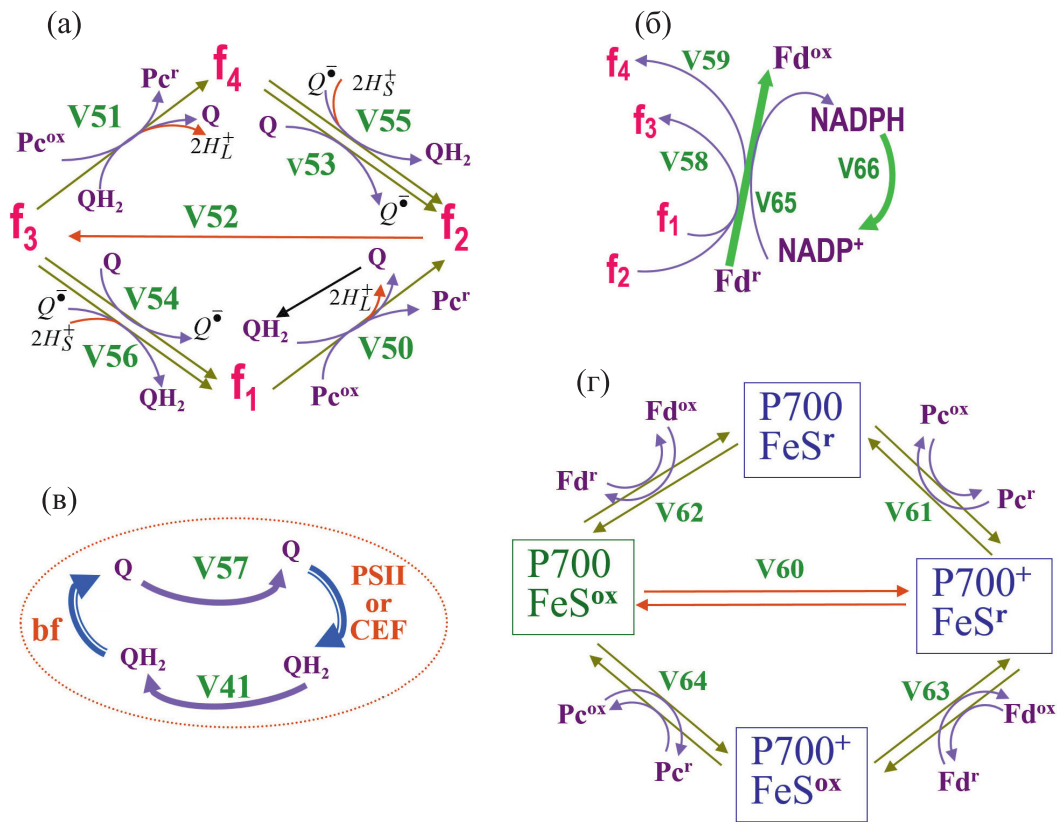
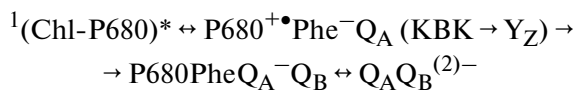


Рис. 2. Обобщенная схема потоков в подсистемах модели тилакоидной мембраны (модель тилакоида). (а) – Реакции цитохромного комплекса *bc₁L*. (б) – Компоненты цепи переноса электронов взаимосвязаны ветвями линейного и циклического потоков электронов (ЛПЭ и ЦПЭ). Стрелки: «V66» – реакция потребления NADPH в строме, «V65» – динамическая константа скорости $k_{FNR}(t)$ активации Fd-NADP-редуктазы (FNR), уравнение (9). (в) – Сопряжение электронного и протонного транспорта (ЭТ/ПТ) в люменальных и стромальных сайтах, включая реакции комплекса фотосистемы II. (г) – Реакции фотосистемы I.

восстановление $P680^{+\bullet}$ при одновременной генерации молекулярного кислорода. Для упрощения предполагали, что притоку одного электрона на окисленный $P680^{+\bullet}$ через тирозин Y_Z [34] сопутствует освобождение одного протона в люмен тилакоида. Отток электронов от донорной стороны РЦ ФСII на акцепторную:



обусловлен разностью редокс-потенциалов компонент ФСII и сопровождается накоплением состояний закрытых РЦ с Q_A^- . Дважды восстановленный и протонированный из стромы пластохинол пополняет мембранный пул PQ/PQH_2 . Окисление молекул PQH_2 в электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) за ФСII ведет к посадке пластохинона PQ в стромальный Q_B -сайт, завершая каталитический цикл H_2O -пластохинон оксидоредуктазы ФСII (рис. 3, 4). В случае отдельного

блока модели ФСII превращение $PQH_2 \rightarrow PQ$ задано [1, 2, 30–34] оттоковой реакцией (41). В составе полной модели тилакоида процессы подсистемы ФСII вовлечены в общую структуру потоков зарядов, где реакции (41) и (57) относятся к диффузионным потокам PQH_2 и PQ .

Модель цитохромного комплекса bc₁L. В системе ТМ комплекс *Cyt bc₁L* влияет на редокс-состояние пула PQH_2/PQ , обеспечивая приток электронов от ФСII в линейном и от ферредоксина в циклическом потоках в двух центрах – люменальный Q_O -сайт (хинолоксидаза) и ориентированный в строму Q_I -сайт (хинонредуктаза). Согласно схеме Q -цикла [6] двухэлектронное окисление $PQH_2|_O$ в люменальном Q_O -центре протекает по двум путям – высоко- и низкопотенциального переноса электронов. Отчуждение одного электрона на железо-серный центр Риска (FeS_R) ведет к восстановлению цитохрома *f* и пластоцианина (PC). Второй электрон от пластохинона $PQH_2|_O$ поступает во внутреннюю цепь восстановления

b_L и b_H , низко- и высокопотенциальных b_6 -гемов и притока затем электронов на $PQ|_i$ молекулу в Q_i -центре: $PQH|_O \rightarrow b_6^L \rightarrow b_6^H \rightarrow PQ|_i$.

Редукция модели *Syt bf* [49] с учетом иерархии времен реакций Q-цикла включила четыре редокс-компоненты $b_L b_H$, $b_L \bullet b_H$, $b_L b_H \bullet$, $b_L \bullet b_H \bullet$, обозначенные f1, f2, f3, f4 на рис. 2а в виде паттерна реакций *Syt bf* в общей модели ТМ [3, 20, 24, 25, 30]. На свету поток электронов в Q-цикл (шаг 41, рис. 2в) обеспечивает через протолитические реакции f1 \rightarrow f2 и f3 \rightarrow f4 (шаги 50, 51, рис. 2а) восстановление РС и, одновременно, b_L а, затем трансмембранно b_H гема (f2 \rightarrow f3, шаг 52). Переходы f4 \rightarrow f2, f3 \rightarrow f1 ведут к продукции семихинона/пластохинона (53, 54, 55, 56, рис. 2а) в Q_i -центре с потреблением двух протонов из стромы. Стрелки 58 и 59 на рис. 2б указывают путь донирования электронов [6, 49] в стромальный хинон-связывающий Q_i -центр за счет вклада ЦПЭ согласно механизму $\Phi CI \rightarrow Fd \rightarrow b_H \rightarrow PQ|_i$ (рис. 1).

Модель фотосистемы I и взаимосвязь потоков в тилакоидной мембране. Перенос электрона от PQH_2 через *Syt bf* восстанавливает пластоцианин

и обеспечивает приток электронов на фракцию P^{+}_{700} катион-радикала РЦ ФСИ. Свет индуцирует быстрое (10^{-12} – 10^{-9} с) разделение зарядов на кофакторах $A_0 - A_1 - F_X$ РЦ ФСИ. Поэтому модель ФСИ (рис. 2г) объединяет кластеры F_X , F_A , F_B как акцептор «FeS». Согласно стадии 60, свет генерирует редокс-состояния $P700^{+}FeS^{\Gamma}$. Вслед за этим происходят обратимые реакции донирования электрона на P^{+}_{700} от РС $^{\Gamma}$ или ухода электрона от кластера FeS^{Γ} ФСИ на ферредоксин (стадии 61, 64, 62, 63, рис. 2г).

Пул молекул $Fd^{r(ox)}$ участвует в потоках линейного (ЛПЭ) и циклического (ЦПЭ) переноса электронов (рис. 2б и схема (1)). Стрелка $Fd^{\Gamma} \rightarrow Fd^{ox}$ указывает на окисление Fd^{Γ} в нескольких сопряженных процессах. Ветви 58 и 59 ЦПЭ связывают паттерны реакций ФСИ и *Syt bf*. Стрелка 65 относится к FNR реакции терминального восстановления $NADP^{+}$ до редокс-эквивалента NADPH потоком ЛПЭ, в то время, как шаг 66 (рис. 2б) связан с потреблением $NADPH \rightarrow NADP^{+}$ (см. рис. 1 и формулу (2)).

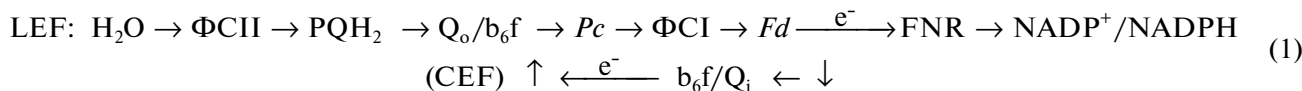


Схема (1) выявляет последовательные события, вызываемые освещением тилакоидных мембран в подсистемах ФСИ, ФСИ, *Syt bf*, связанных процессами переноса электронов и протонов через пулы подвижных переносчиков от входа до выхода системы ТМ.

Рис. 1 показывает потоки зарядов (электроны, протоны (H^{+}), противоионы) в компартментах ТМ. Стадии ЛПЭ и ЦПЭ сопряжены с освобождением H^{+} в люмен (КВК ФСИ, Q_o -центр *Syt bf*) и захватом H^{+} из стромы (Q_B -сайт ФСИ, Q_i -центр *Syt bf*). В результате образование градиента электрохимического потенциала H^{+} ($\Delta \tilde{\mu}_{H^{+}}$): на мембране тилакоида обеспечивает синтез АТФ. Процессы потребления метаболитов АТФ \rightarrow АДФ и $NADPH \rightarrow NADP^{+}$ (рис. 1) для упрощения определены через скорости оттоковых реакций:

$$V_{NADP} = k_{NADP} \times NADPH / (K_{NADP} + NADPH), \quad (2)$$

$$V_{ATP} = k_{ATP} \times ATP / (K_{ATP} + ATP), \quad (2a)$$

где k_{NADP} , K_{NADP} и k_{ATP} , K_{ATP} задают эффективные параметры переходов $NADPH \rightarrow NADP$ и $ATP \rightarrow АДФ$ для моделирования сопряжения си-

стемы ТМ и стромальных циклов потребления энергии, запасенной в световых реакциях.

Динамические параметры описания скоростей в модели тилакоида. Принципы построения модели ТМ и системы обыкновенных дифференциальных уравнений подробно представлены в работах [3, 20, 24, 25]. Запись дифференциальных уравнений в балансовой форме:

$$\frac{dX_i}{dt} = v_{\text{production}}(X_i(t)) - v_{\text{consumption}}(X_i(t))$$

суммирует скорости производства $v_{\text{production}}(X_i(t))$ и потребления $v_{\text{consumption}}(X_i(t))$ каждой i -й компоненты ($X_i(t)$) системы ТМ. Концентрации $X_i(t)$ в мМ определяют размерности скоростей в $\text{мМ} \cdot \text{с}^{-1}$, причем скорости задаются как нелинейные функции от концентраций компонент в согласии с механизмами процессов, обсужденных выше.

При описании процессов использованы кинетические параметры прямой k_n и обратной k_{-n} констант скоростей и константа равновесия K_{eq} редокс-реакций:

$$k_n = k_{-n} \cdot K_{eq}; \quad K_{eq} = \exp\left(-\frac{n_e \cdot F \cdot \Delta E_m}{RT}\right). \quad (3)$$

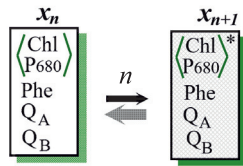


Рис. 3. Схема распада синглетного возбуждения $^1\text{Chl}^*$ антенны фотосистемы II. Редокс-формы реакционного центра фотосистемы II включают: $\left\langle \begin{matrix} \text{Chl} \\ \text{P680} \end{matrix} \right\rangle$ – пигменты хлорофилла антенны и P680 в РЦ; Phe – феофитин, первичный акцептор электронов ФС2; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы. Даны две редокс-формы для реакций с номерами $n = 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32$ (см. рис. 4). Генерация возбужденного синглетного состояния $^1\text{Chl}^*$ задается световой константой $k_L = k_n$, предполагая $k_L = 200 \text{ с}^{-1}$ для PFD 300 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ [25, 30]. Распад $^1\text{Chl}^*$ определен суммой $k_{-n} = k_F + k_D$, где k_F – константа скорости испускания флуоресценции, $k_D(t)$ – динамическая константа скорости безизлучательной диссипации энергии в антенне ФСII, уравнение (8).

Здесь ΔE_m – разность эффективных среднеточечных редокс-потенциалов носителей электронов, а n – число электронов, перенесенных в редокс-реакции. Оценки K_{eq} , взятые из литературы [11–13], уточнялись при анализе экспериментов *in vivo* [1–3, 24, 25].

1. *Электрический трансмембранный потенциал, рН люмена и стромы.* Регуляторное влияние электрической компоненты $\Delta\Psi$ электрохимического потенциала $\tilde{\mu}_{H^+}$ на перенос электронов обсуждалось в работах [2, 23–26, 29, 30] и учтено выражением:

$$\tilde{K}_{\text{eq}}(\Delta\Psi) = \exp(-\alpha \cdot \Delta\Psi \cdot (F/RT)) \cdot K_{\text{eq}}. \quad (4)$$

Здесь K_{eq} – константа равновесия в отсутствии мембранного потенциала (т. е. $\Delta\Psi = 0$). Фактор α задает часть $\Delta\Psi$, продуцируемую отдельным шагом переноса электрического заряда по нормали к мембране [50, 51] и влияющую на перенос заряда в течение данного шага.

2. *Антенные комплексы и световая активация FNR-редуктазы.* Поток фотонов определяет «давление» экситонного возбуждения $\left\langle \begin{matrix} \text{Chl} \\ \text{P680} \end{matrix} \right\rangle \rightarrow \left\langle \begin{matrix} \text{Chl} \\ \text{P680} \end{matrix} \right\rangle^*$ в антенне, когда избыточное накопление закрытых РЦ затрудняет фотохимическое разделение зарядов. Защита системы от «давления возбуждения» с дезактивацией возбужденных состояний и тушением флуоресценции обеспечена непосредственно в антенне ФСII.

Согласно рис. 3 распад синглетного возбужденного состояния $^1\text{Chl}^*$ РЦ ФСII происходит путем испускания флуоресценции (k_F), которому сопутствует тепловая диссипация (k_D) в антенне. Суммарная скорость распада $^1\text{Chl}^*$ задается константой k_A :

$$k_A = k_F + k_D. \quad (5)$$

Потери возбуждения в антенне в процессах флуоресценции в модели ФСII определяются состояниями с синглетным возбуждением $^1\text{Chl}^*$, т. е. модельными формами в колонках 2 и 6 (рис. 4):

$$F(t) = S \cdot (x_2(t) + g_2(t) + y_2(t) + z_2(t) + x_6(t) + g_6(t) + y_6(t) + z_6(t)) \cdot k_F. \quad (6)$$

Диссипация энергии в антенне задана константой скорости $k_D(t)$ [35, 36] в виде зависящего от времени динамического параметра по аналогии с [24, 25]:

$$k_D(t) = k_{D\text{const}} + k_{D\text{var}} \cdot q(t), \quad (7)$$

где компоненты диссипации энергии указывают на величины: базовую $k_{D\text{const}}$, минимальную после темновой адаптации, и $k_{D\text{var}}$, достигаемую в присутствии тушителей в антенне ФСII. Фактор $0 < q(t) < 1$ определяет возрастание тепловых потерь путем распада $^1\text{Chl}^*$ вследствие запуска qE-тушения при низком люменальном рН согласно уравнению Хилла:

$$k_D(t) = k_{D\text{const}} + k_{D\text{var}} \cdot \frac{[H_L^+(t)]^n}{[H_L^+(t)]^n + K_Q^n}, \quad (8)$$

где концентрация $[H_L^+(t)]$ вычисляется при моделировании, параметры n (коэффициент Хилла) и K_Q (константа Михаэлиса) вместе с $k_{D\text{const}}$ и $k_{D\text{var}}$ находили фитированием модели ТМ по измерениям длительной ИФ без явного рассмотрения механизма qE-тушения.

В модели ТМ реакция ЛПЭ $\text{Fd}^+ \rightarrow \text{FNR} \rightarrow \text{NADP}^+$ определена константой скорости:

$$k_{65}(t) = k_{\text{FNR}}(t) = k_{\text{FNRmax}} \cdot (1 - 0.99 \cdot \exp(-t/\tau_{\text{FNR}})). \quad (9)$$

Здесь после темновой адаптации, в момент $t = 0$ базовый уровень $k_{\text{FNR}}(t)$ равен 0.01 от максимальной величины k_{FNRmax} , достигаемой с характеристическим временем τ_{FNR} при усилении активности FNR.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЙ И МОДЕЛИРОВАНИЯ

Монокультуры микроводорослей в лабораторных условиях. Лабораторные культуры микрово-

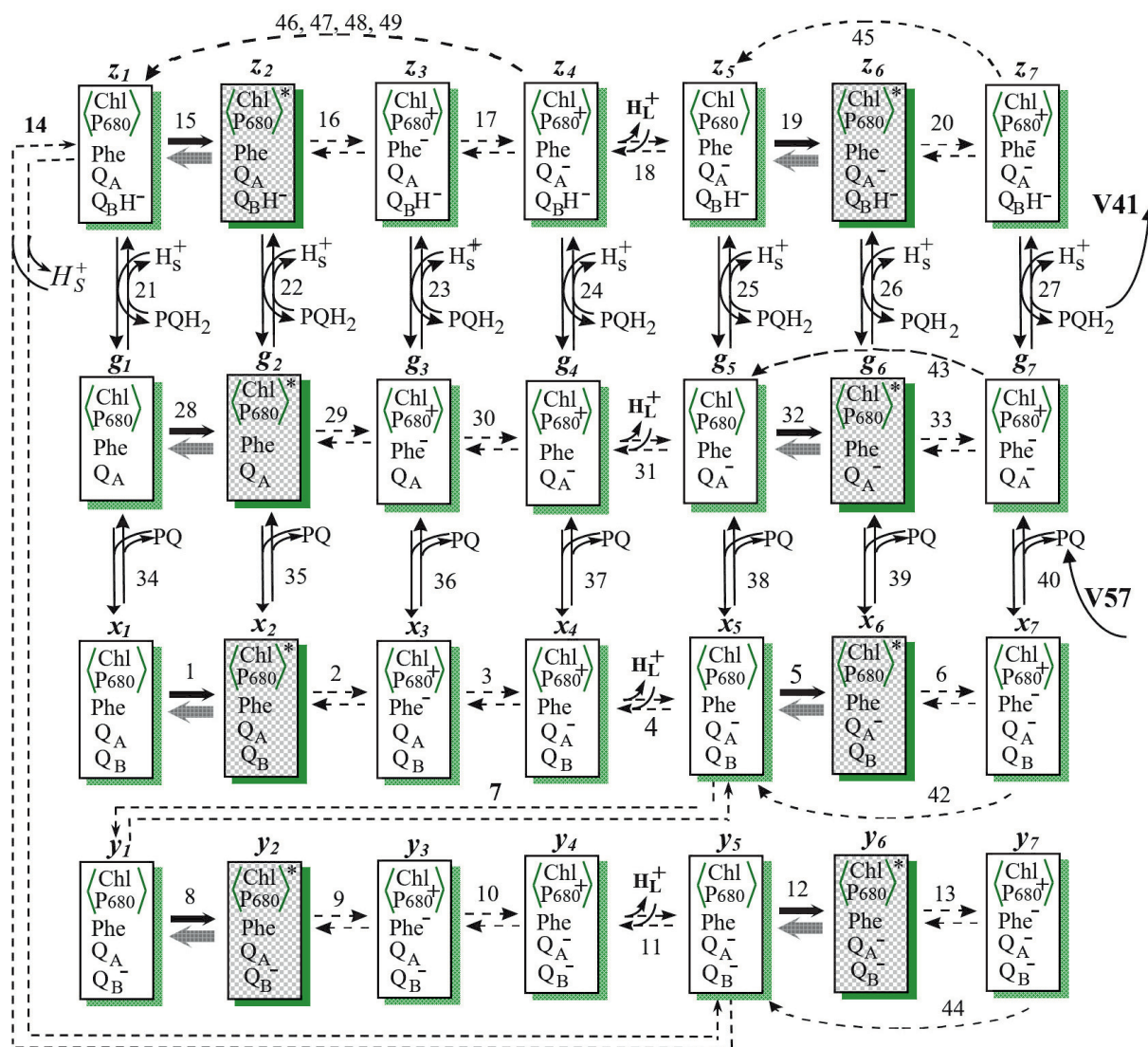


Рис. 4. Схема каталитического цикла фотосистемы II. Каждый прямоугольник – кинетическое состояние ФСII, определяемое редокс-состоянием входящих в него переносчиков электронов. Штриховкой показаны состояния, способные к испусканию квантов флуоресценции. Chl и P680 – хлорофилл антенны ФСII и реакционного центра; Phe – первичный акцептор электронов феофитин; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы электронов. PQ – пластохинон; PQH_2 – пластохинол; H_L^+ – протоны, выделяемые в люмен тилакоида, H_S^+ – протоны, поглощаемые из стромы тилакоида. Жирные стрелки – световые стадии. Цифры рядом со стрелками и буквы над прямоугольниками ($x_i, y_i, z_i, g_i, i = 1, \dots, 7$) соответствуют номерам реакций и обозначениям переменных модели.

дорослей исследовали, предполагая, что в условиях постоянной среды обитания характеристики клеток на равных стадиях роста сохраняются постоянными.

Фитирование модели тилакоидной мембраны по измерениям индукции флуоресценции.

1. Культура *Scenedesmus obliquus*. На рис. 5а приведены результаты измерений ИФ *Scenedesmus obliquus* (далее *Scenedesmus*) при культивировании микроводоросли в среде на стадии стационарного роста. Изменения интенсивности

ИФ в ответе клеток *Scenedesmus* на освещение детектировали на интервале времени до 10 мин при двух интенсивностях актиничного света – 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹, соответствующих 60% (точки ФЛ1) и 40% (точки ФЛ2) от максимальной плотности потока квантов света (PFD), равной 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Шкала, на которой показана интенсивность флуоресценции, выбрана таким образом, что начальный уровень ФЛ при значении плотности фотонного по-

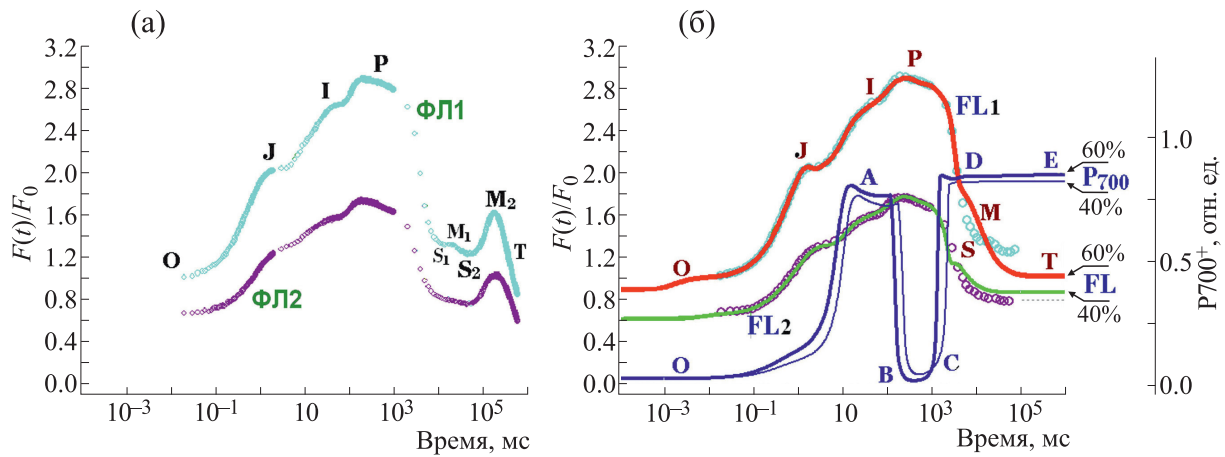


Рис. 5. Фитирование модели тилакоидной мембраны по измерениям на микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*). (а) – Детекция сигналов индукции флуоресценции клеток *Scenedesmus* от 20 мкс до 10 мин (ФЛ1 и ФЛ2) при интенсивности актиничного света 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹, соответствующей 60% и 40% от максимальной плотности потока квантов PFD 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Начальный уровень интенсивности флуоресценции при PFD 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ сопоставлен значению «1». (б) – Траектории индукции флуоресценции FL1 и FL2 фитируют решения модели ТМ (рис. 1–4, табл. 1) по измерениям ИФ клеток *Scenedesmus* при освещении 60% и 40% (ФЛ1 и ФЛ2) в интервале времени от микросекунд до 100 с. Траектории P700-60% и P700-40% (соответственно толстая и тонкая линии) – динамика окисления–восстановления P700 редокс-кофактора ФС1.

тока 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ полагается равным «1».

Данные измерений ОJIPСМТ кинетики ИФ (рис. 5а) показывают стадии нарастания ФЛ до пика Р и последующего спада к стационарному Т-уровню. Вместе с тем промежуточные стадии спада ФЛ содержат локальные минимумы S₁₍₂₎ и максимумы M₁₍₂₎. Кинетические ОJIPС₁M₁S₂M₂T-фазы наблюдаются для длительных измерений ИФ *Scenedesmus* при потоках света 60 и 40% (ФЛ1, ФЛ2, высокий и умеренный свет). Очевидно, что стадии M₁S₂M₂T на временах 2–5 мин проявляются независимо от освещенности.

Расчеты в модели тилакоида проведены (рис. 5б) на шкале времени от пикосекунд до минут. Модельные траектории FL1 и FL2 соответствуют результатам фитирования по кривым ИФ, измеренным (ФЛ1, ФЛ2, рис. 5а) при 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Согласно расчетам, измерения ИФ клеток *Scenedesmus* на стадиях ОJIPС₁(S₂)Т воспроизведены количественно для фаз ОJIP-нарастания от 10 мкс до 2 с и частично – для PS₁M₁S₂T-стадий спада в диапазоне времени до 100 с (рис. 5б).

Влияние фактора State transition на кинетику ИФ не учтено в данной работе с целью упрощения расчетов, а, также для выяснения параметров, наиболее существенных для воспроизведения формы кривых ИФ на временах до 100 с без учета стадий S₂M₂T на временах до 10 мин.

Количественные результаты фитирования модели тилакоида определены в табл. 1. В ней приведены значения параметров, которые соответствуют механизмам и факторам регуляции процессов, представленным на рис. 1.

2. *Культура Chlorella vulgaris.* Изменения флуоресценции клеток *Chlorella* измеряли (рис. 6а) в интервале 2 с. На рис. 6а результаты измерений ИФ *Chlorella* при действии света одинаковой интенсивности (2000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹) приведены точками ФЛ3час, ФЛ26час, ФЛ48час на стадиях роста 3, 26 и 48 ч соответственно. Результаты фитирования «малой» модели ФСII (траектории FL3, FL26 и FL48 на рис. 6б) по измерениям ИФ на образцах проб культуры из биофотореактора отражают кинетику ОJIPС-фаз нарастания и, частично, спада после максимума Р кривой ИФ. Модель [24, 25] процессов в тилакоиде полностью воспроизводит ОJIPС-кинетику изменений ИФ *Chlorella* на временах до 2 с (F1 и FL2 на рис. 6в). при достижении максимума Р (F_m) и минимального начального уровня F₀ ИФ. Вместе с тем показано моделирование (P700, рис. 6в) динамики редокс-превращений катионрадикала P700⁺ [25, 38, 39]. Расчетный ход кривых флуоресценции на временах t > 10 сек теоретически соответствует известным данным по кинетике PSMT-фаз ИФ [4, 37].

Анализ параметров модели тилакоида для процессов фотосинтеза микроводорослей. Значения параметров в табл. 1 получены при достижении в вычислениях адекватной динамики редокс-пре-

Таблица 1. Параметры процессов тилакоидной мембраны (модель ТМ)

Переходы и номера реакций модели ТМ	$k_n, \text{мс}^{-1}, K_{EQn}$			
	40%	60%	26 ч	48 ч
Фотосистема II				
A_{eff} – Эффективное количество пигментов антенного комплекса	$A_{\text{eff}} = 140$		112	108
${}^1(\text{Chl-P680})^*\text{Ph} \leftrightarrow \text{Chl-P680}^+\text{Ph}^-(\text{QA})$	$k_2^{\text{op}} = 320000000 / A_{\text{eff}}$			
$k_2^{\text{op}} = k_2^{\text{op}} / K_{EQ2}$	$2.29 \times 10^6 / 32 = 7.14 \times 10^4$		$2.96 \times 10^6 / 16 = 1.85 \times 10^5$	
${}^1(\text{Chl-P680})^*\text{Ph} \leftrightarrow \text{Chl-P680}^+\text{Ph}^-(\text{QA}^-)$ $k_5^{\text{cl}} = k_2^{\text{op}} / a; K_{EQ5} = K_{EQ2} / b$	$a = 8; k_5^{\text{cl}} = 2.86 \times 10^5$ $b = 4; K_{EQ5} = 32 / 4$		$a = 6.4; k_5^{\text{cl}} = 4.63 \times 10^5$ $b = 5; K_{EQ5} = 20 / 5$	
Первый электрон в Q_B -сайт, k_7	3.2			
K_{EQ7}	20–16		12.5–10	
Второй электрон в Q_B -сайт, k_{14}	1.75			
K_{EQ14}	8–10			
Выход PQH_2 в фазу мембраны, k_{21}	0.8			
Диссипация ${}^1\text{Chl}^*$ в антенне k_{HD}	$(3+12) \cdot 10^4$	$(3+38) \cdot 10^4$	$(2+10) \cdot 10^4$	
Закрытые РЦ, безизлучательная рекомбинация зарядов $\text{P680}^+\text{Phe}^-$, k_{42-45}	$1.3 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^5$	
	$5.0 \cdot 10^5$	$5.8 \cdot 10^5$	$2.2 \cdot 10^5$	
	$6.4 \cdot 10^5$	$6.8 \cdot 10^5$	$3.0 \cdot 10^5$	
Безизлучательная рекомбинация зарядов $\text{P680}^+\text{QA}^-$, k_{46-49}	1.5	1.8	2.2	
	1.8	2.0	2.8	
	3.0	3.2	3.8	
Электронтранспортная цепь				
Световая константа	0.56, 0.48	0.84, 0.48	0.64	0.62
Комплекс $\text{Cyt } b_6/f, b_L \rightarrow b_H$, V52	0.30	0.42–0.40	0.48	0.72
Циклический транспорт вокруг ФСИ, V58, V59	0.008, 0.01		0.015, 0.001	
Электрохимический потенциал				
Стационарное состояние рН люмена	6.53	6.44	6.84	6.83
Стационарное состояние рН стромы	8.44	8.46	8.32	8.27

Примечание. Значения параметров получены при достижении в вычислениях адекватной динамики редокс-превращений катион-радикала P700^+ [39, 40] вместе с фитированием модели ТМ по измерениям ИФ на клетках *Scenedesmus* и *Chlorella* (рис. 5б и 6в); $(\text{QA})^-$ – открытые, (QA^-) – закрытые реакционные центры.

вращений катион-радикала P700^+ [25, 38, 39] вместе с фитированием модели тилакоидной мембраны по измерениям ИФ на клетках *Scenedesmus* и *Chlorella* (рис. 5б и 6в). Параметры переноса зарядов, индуцированного светом высокой и умеренной интенсивности в клетках *Scenedesmus*, даны в столбцах «60%» и «40%». Столбцы «26 ч» и «48 ч» показывают результаты для культуры *Chlorella* на стадиях роста 26 и 48 ч. Величина

параметра, одинаковая для вариантов расчетов, помещается в одной ячейке.

1. Реакции переноса электронов в фотосистеме II. Из табл. 1 видно, что параметры переноса электронов по редокс кофакторам реакционных центров ФСИ близки по величинам или совпадают для микроводорослей *Scenedesmus* и *Chlorella*.

В вычислениях кинетическая константа скорости восстановления Phe была принята равной $3.2 \cdot 10^8 \text{мс}^{-1}$ (табл. 1), но зависела [4, 5, 11] также от

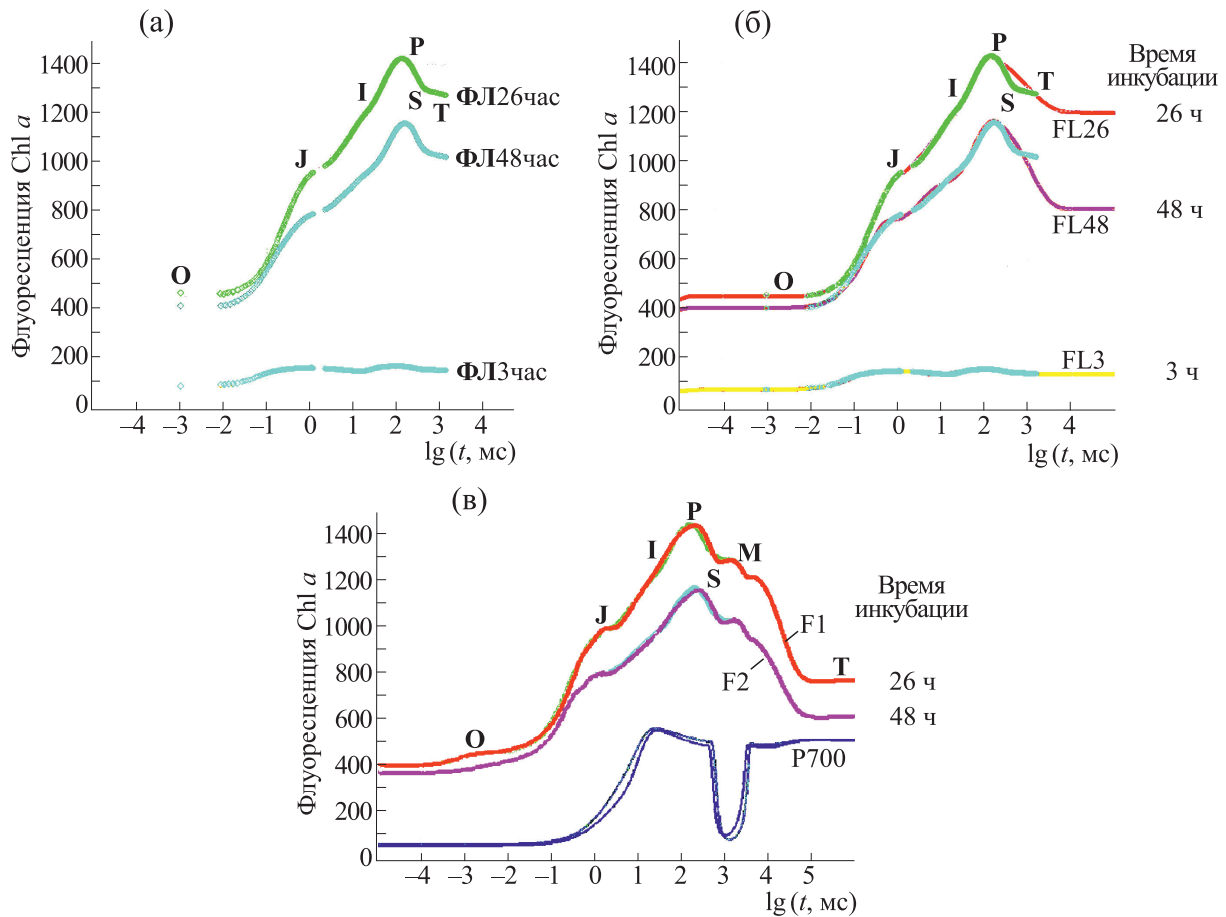


Рис. 6. Фитирование модели изолированной ФСII и модели тилакоидной мембраны по измерениям на клетках *Chlorella vulgaris* при действии света $2000 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. (а) – Измерения индукции флуоресценции в интервале времени от 5 мкс до 2 с на образцах *Chlorella* стадий роста 3, 26 и 48 ч (ФЛ-3, ФЛ-26 и ФЛ-48 соответственно). (б) – Результаты фитирования «малой» модели ФСII расчетными кривыми ИФ FL3, FL26, FL48 по измерениям ИФ на стадиях OJIPС-фаз. (в) – Модель ТМ [25] количественно воспроизводит в расчетах ИФ F1 и F2 (см. табл. 1, «26 ч» и «48 ч») OJIPС-кинетику ИФ культуры *Chlorella* стадий роста 26 и 48 ч. Расчетный ход кривых флуоресценции на временах $t > 10$ с и моделирование динамики редокс-превращений катион-радикала P700^+ соответствуют известным данным [39, 40].

параметра эффективного количества пигментов антенны $A_{\text{Eff}} = N_{\text{Ant}}$, который оказался различным для двух таксонов. Кинетика обратной реакции возбуждения антенн $^1(\text{Chl-P680})^*$ зависит от констант равновесия K_{EQ2} и K_{EQ5} , показанных в табл. 1 с учетом факторов a и b снижения эффективности разделения зарядов в закрытых (с Q_A^-) по сравнению с открытыми (Q_A) РЦ.

Согласно схеме модели ФСII (рис. 4), перенос электронов от донорной на акцепторную сторону ФСII и восстановление пула хинонов определены через константы скоростей реакций $k_{7,14}$ и k_{21} . Количественное описание выявляет одинаковые для двух таксонов *Scenedesmus* и *Chlorella* величины $k_{7,14} = 3.2, 1.75 \text{ мс}^{-1}$ и $k_{21} = 0.8 \text{ мс}^{-1}$ при неко-

торых отличиях констант равновесия $K_{\text{EQ7,14,21}}$. Однако величины параметров, выявляемых для *Chlorella*, необходимо в будущем проверить на основе измерений более длительных, чем 10 с.

2. *Диссипативные реакции рекомбинации зарядов в фотосистеме II.* Описание реакций ФСII (рис. 3 и 4) учитывает тепловые потери при диссипации возбужденных состояний антенн (k_{D}) либо при рекомбинации зарядов (k_{42+49}).

Четыре строки модели ФСII отличаются типом редокс-компонент Q_B -сайта, когда возможны следующие состояния вторичного хинона: нейтральный (Q_B), отсутствует (P_{empty}), восстановленный (Q_B^-), дважды восстановленный и протонированный (Q_BH^-). При анализе ИФ

Таблица 2. Константы скорости безызлучательной рекомбинации зарядов $P680^+Phe^-$ (k_{42}) и $P680^+Q_A^-$ (k_{46})

Реакции рекомбинации	$Phe^- \rightarrow P680^+$ (k_{42} , $мс^{-1}$)	Q_A^- и $P680^+$ (k_{46} , $мс^{-1}$)
Модель фотосистемы II Лист гороха	1200 и 300 мкмоль фотонов·м ⁻² ·с ⁻¹	
	$2.75 = 5.5 \cdot 10^8 / 2 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$	30%, 5800 и 4500 с ⁻¹
Модель тилакоида <i>Synechocystis</i>	3000 и 1000 мкмоль фотонов·м ⁻² ·с ⁻¹	
	$3.2 = 4.0 \cdot 10^8 / 1.25 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$	55%, 2800 и 1800 с ⁻¹
Модель тилакоида <i>Scenedesmus</i>	1800 и 1200 мкмоль фотонов·м ⁻² ·с ⁻¹	
	15.4%, $1.5 \cdot 10^8$ и $1.3 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$	20%, 1800 и 1500 с ⁻¹

Примечание. Константы фитированы для двух интенсивностей актиничного света для строки модели ФСII (рис. 4) с нейтральным Q_B .

микроводоросли *Scenedesmus* для каждой из строк нами выявлены константы скоростей рекомбинации зарядов: для $Phe^-P680^+ - k_{42-45}$ и для $Q_A^-P680^+ - k_{46-49}$ (табл. 1). Рассмотрим результат на примере освещенности PFD 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Реакции безызлучательной рекомбинации зарядов протекают одинаково, если в Q_B -сайте вторичный хинон нейтрален или отсутствует, а именно, $k_{42} = k_{43} = 1.3 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$; $k_{46} = k_{47} = 1500 \text{ с}^{-1}$. Увеличение значений k_{44} до $5.0 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, а k_{48} — до 1800 с^{-1} (строка Q_B^-), и далее, k_{45} — до $6.4 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, k_{49} — до 3000 с^{-1} (Q_BH^-) проявляется для тех состояний РЦ, в которых вследствие переноса электронов при освещении накоплен электростатический заряд на вторичном хиноне Q_B -сайта. Эффект, возможно, связан с влиянием локальных электрических полей, возникающих в РЦ при освещении на перенос электрона [52, 53].

Диссипативные потери образцов можно сравнить, изменяя в модели уровень поглощения фотонов. Полученные при двух интенсивностях потока света константы безызлучательной рекомбинации (k_{42-45} ; k_{46-49}) удобно сравнить для минимальных величин в нейтральном Q_B -сайте (k_{42} , k_{46}), приведенных в табл. 2. Измерения длительной ИФ микроводоросли *Scenedesmus* проведены здесь при освещении 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Расчеты в модели тилакоида при полуторакратном различии в поглощении фотонов показывают увеличение безызлучательной рекомбинации $P680^+Phe^-$ на ~15% и $P680^+Q_A^-$ — на ~20%.

Параметры k_{42} , k_{46} увеличены в случае освещения 60% по сравнению с 40% (табл. 1) для РЦ с редокс состояниями Q_B , Q_B^- и Q_BH^- . Однако за-

висимость величин k_{42-45} ; k_{46-49} (табл. 1) от стадии роста *Chlorella* (26 и 48 ч) не выявлена.

В итоге результаты показывают возможности многопараметрического анализа системы ТМ и доказывают необходимость длительных измерений ИФ с целью наблюдения регуляторных процессов [5–7, 9, 40, 44, 45] и изучения их механизмов. Вместе с тем компактная модель ФСII применима в оперативном анализе с целью изучения и сравнения особенностей фотосинтетического аппарата выбранных объектов.

Фитопланктон каскада водоемов при «летовании». Фитопланктон (фитоценоз) — это сообщество планктонных организмов [8], которые могут осуществлять процесс фотосинтеза и являются первичным звеном трофической цепи водной экосистемы. Если состояние водоема стабильно, то можно полагать, что состояние фитоценоза характеризует водоем как объект исследования [8].

При летовании каскада трех проточных прудов бассейна реки Темерник наблюдались устойчивые режимы функционирования для каждого из водоемов. А именно, после «летования» в 2017 г. для среднего в каскаде пруда № 2 характерна чистая вода (контроль) и высокая продуктивность популяции малька. В то же время верхний по течению пруд № 1 существует в состоянии биологической деградации, а в нижнем пруду № 3 происходит цветение воды. Мы взяли пробы фитопланктона из трех прудов, измерили кривые ИФ (рис. 7а) и применили модельный анализ (рис. 7б,в) процессов ФСII для изучения состояния фитоценозов верхнего, среднего и нижнего прудов (№№ 1, 2 и 3 соответственно).

Анализ состояния фитопланктона водоемов в модели фотосистемы II. На рис. 7а показан ход кривых ИФ на интервале до 1 с при освещении постоянным светом неизменной интенсивности 4500 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ для проб фитопланктона, взятых с глубины 0.3 м от поверхности прудов №№ 1–3. На рис. 7а кривые ИФ трех

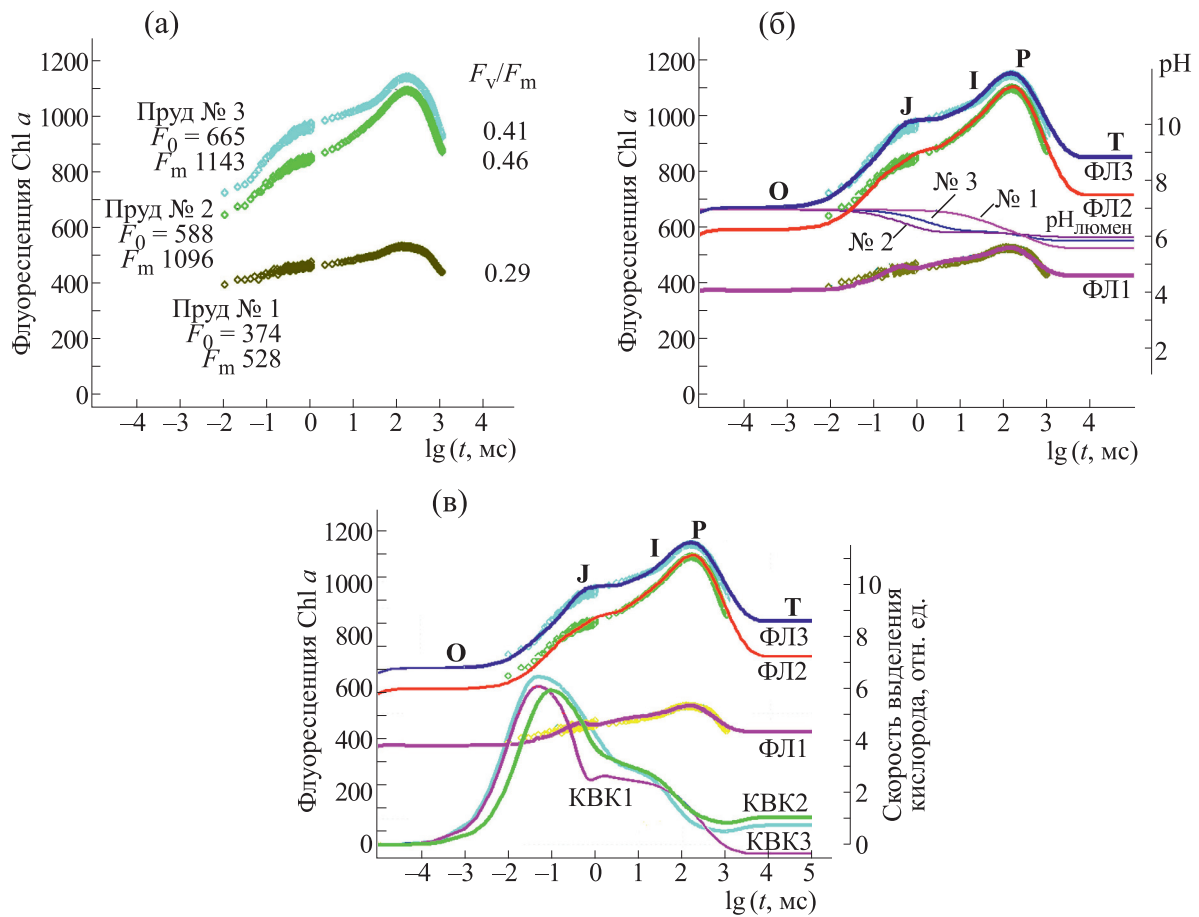


Рис. 7. Фитирование модели изолированной фотосистемы II по измерениям индукции флуоресценции на пробах фитопланктона каскада водоемов. (а) – Сигналы ИФ детектировали до 1 с при интенсивности актиничного света $4500 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на пробах фитопланктона трех водоемов в различном состоянии: средний в каскаде пруд № 2 (контроль), верхний по течению пруд № 1 (деградация), нижний пруд № 3 с цветением воды. Указаны также уровни максимума (F_m) и минимума (F_0) индукции флуоресценции. Значение $F_v/F_m = 0.46$ максимально для фитоценоза № 2. (б), (в) – Траектории индукции флуоресценции. ФЛ2, ФЛ1 и ФЛ3 фитируют модель ФСII (схема на рис. 4, табл. 3) по измерениям ИФ. (б) – Динамика закисления люмена $\text{pH}_{\text{люмен}}$ получена в расчетах для фитоценозов № 1, № 2, № 3 при стационарных значениях pH в люмене: $\text{pH}_{\text{№1}} = 5.2$, $\text{pH}_{\text{№2}} = 5.8$, $\text{pH}_{\text{№3}} = 5.5$. (в) – Траектории КВК-1-2-3 рассчитаны через сумму скоростей донирования электрона на P680^+ в четырех реакциях модели ФСII с $n = 4, 11, 18, 31$ (см. схему на рис. 4; константа скорости k_4 в табл. 3). Графики КВК-1-2-3 позволяют сравнить (в отн. ед.) уровни генерации кислорода фитоценозов № 1, № 2 и № 3.

водоемов не нормированы. Поэтому очевидны отличия начального и максимального уровней испускания флуоресценции F_0 , F_m и характера кинетических стадий нарастания ИФ. Очевидно, что переменная флуоресценция фитопланктона (выход F_v/F_0) для пробы «верхний пруд № 1» значительно снижена по сравнению с данными для водорослей *in vivo* (рис. 5а и 6а).

Оперативные вычисления в модели процессов ФСII фитированы по измерениям на пробах №№ 1–3. Модельные траектории ФЛ1, ФЛ2, ФЛ3 (рис. 7б,в) количественно воспроизводят кинетические стадии нарастания и начальной стадии спада ИФ, наблюдаемые для трех водое-

мов. Найденные в модели ФСII величины параметров собраны в табл. 3. Выше в табл. 1 набор параметров для *Chlorella* и *Scenedesmus* дан для более сложного расчета, когда блок модели ФСII включен в модель тилакоида.

Сравнение данных в табл. 1 и 3 выявляет близость или совпадение величин параметров процессов РЦ ФСII, найденных для двух монокультур микроводорослей и для проб фитопланктона. Так, совпадение констант равновесия или кинетических очевидно для переноса первого/второго электрона на пласто/семихинон (Q_B/Q_B^-) стромального сайта ФСII.

Таблица 3. Определение параметров в результате фитирования модели изолированной фотосистемы II по сигналам индукции флуоресценции для проб из каскада прудов

Номера реакций n и параметры k_n (мс^{-1}) / K_{Eqn}				Состояния и процессы
	Пруд № 1	Пруд № 2	Пруд № 3	Фитоценозы водоемов
k_1	0.24	0.48	0.48	Световая константа
A_{ntn}	80	200	200	A_{eff} – Эффективный размер антенн ФСII
$n = 2$	320000000 / A_{eff} ; 16			Первичное разделение зарядов открытых РЦ
k_{da}	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	Тепловая диссипация возбуждения антенны
$n = 7$	3.2/20			Перенос 1-го электрона на пластохинон Q_B -сайта
$n = 14$	1.6/10	1.6/8	1.6/10	Перенос 2-го электрона на семихинон Q_B -сайта
$n = 21$	0.4/1.6	0.4/1.6	0.8/2	Выход PQH_2 в фазу мембраны
$n = 34$	0.2/0.1	0.2/0.1	0.1/0.8	Заполнение Q_B -сайта молекулой хинона
$n = 41$	0.05/5000			Отток электронов от ФСII при окислении PQH_2
$n = 46$	2.4	2.4	1.4	Безизлучательная рекомбинация $P680^+QA^-$
$n = 42$	$4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	10^5	Рекомбинация зарядов $P680^+Phe^-$ закрытых РЦ
k_4	1.4	4.0		Константы скорости донирования электрона на катион радикал $P680^+$
k_2/a ; K_{Eq2}/b	$a = 5$ $b = 8$	$a = 5$ $b = 8$	$a = 5$ $b = 10$	Факторы a и b разделения зарядов в закрытых РЦ

Примечание. Состояние прудов: непродуктивный (№ 1), «контроль» (№ 2), цветущий (№ 3).

Паттерны флуоресценции фитоценоза как маркеры состояния водоемов. Параметр тепловой диссипации (k_D) в антенне (формула (5)) согласно табл. 3 отличается для трех фитоценозов: $5 \cdot 10^4 \text{ мс}^{-1}$ – № 2 (контроль), $8 \cdot 10^4 \text{ мс}^{-1}$ – № 3 (цветение), $2 \cdot 10^5 \text{ мс}^{-1}$ – № 1 (деградация). Таким образом, потери энергии света за счет тепловой диссипации в антенне РЦ ФСII увеличены по сравнению с величиной в контроле на 60 и 300% для водоемов ниже и выше по течению соответственно. Интенсивность света, вызывающая сигналы ИФ, одинакова для проб фитоценозов и не может быть причиной различий величин параметра $k_{da} = k_D$.

Модель ФСII объясняет усиление тепловой диссипации в антеннах степенью закисления люмена при освещении. Действительно, фитированию кривых ИФ проб №№ 1–3 на рис. 7б соответствуют три варианта расчетов кинетики рН люмена тилакоидных мембран с минимальным рН для верхнего водоема № 1. Стационарный уровень рН люмена для проб №№ 1–3 составил $\text{pH}_{\text{№1}} = 5.2$, $\text{pH}_{\text{№2}} = 5.8$ и $\text{pH}_{\text{№3}} = 5.5$ соответственно.

Состав фотосинтезирующих компонент фитопланктона каждого из трех прудов не изучался. Однако нами измерено содержание форм хлорофилла в пробах №№ 1–3. Суммарное возрастание концентрации Хл в прудах № 2 и № 3 по сравнению с верхним прудом № 1 согласуется с результатом фитирования эффективного размера антенн комплекса ФСII – A_{eff} . Размер антенн, равный 200, получен для прудов № 2 и № 3 и снижен до 80 для пруда № 1, находящегося в состоянии биологической деградации.

В модели ФСII, фитированной по ИФ фитопланктона, траектории «КВК1–3» на рис. 7в выявляют генерацию O_2 при условии, что эти траектории рассчитаны как сумма скоростей донирования электрона на $P680^+$ в четырех реакциях модели ФСII с $n = 4, 11, 18, 31$.

Очевидно, что генерация O_2 падает (до нуля) при моделировании фитоценоза неполноценного пруда № 1 (КВК1) по сравнению с фитоценозом «контроль» (КВК2), в то время как в цветущем пруду № 2 (КВК3) уровень генерации O_2 сохраняется. Результаты объяснимы снижением от 4000 до 1400 с^{-1} скорости восстановления $P680^+$,

усредненной по S_j -состояниям КВК (табл. 3, « k_4 », «Пруд 2», «Пруд 1»).

Результаты моделирования процессов ФСII на основе анализа быстрых кривых ИФ фитопланктона предоставили параметры, соотносимые с типом каждого из трех водоемов. Однако, для анализа механизмов процессов, стоящих за отличиями фитоценозов, необходимо получить расчеты в полной модели тилакоида по длительным измерениям ИФ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерения длительной ИФ на клетках *Scenedesmus* получили в интервале от 20 мкс до 10 мин в ответ на свет сильной и умеренной интенсивности (точки ФЛ1-60% и ФЛ2-40%, рис. 5а) и фитировали в модели тилакоидной мембраны (траектории FL1 и FL2, рис. 5б, табл. 3). В результате фитирования определены значения параметров процессов в системе ТМ (рис. 1), последовательность и динамика процессов переноса электронов и энергизации мембраны на интервале времени от пикосекунд до 100 с.

Энергозависимое qE-тушение в антенне фотосистемы II. В результате фитирования модели ТМ по ИФ клеток *Scenedesmus*, вызываемой светом 60%, на рис. 8а можно выявить динамику компонент энергизации мембраны тилакоида – рН люмена и стромы ($pH_L(t)$, $pH_S(t)$), а также электрического потенциала ($\Delta\Psi(t)$). Вместе с траекториями pH_L , pH_S , $\Delta\Psi$ дан график $k_D(t)$ ($k_{D_{Ant}}$, рис. 8а), определяющий ход во времени динамического параметра $k_D(t) = k_{D_{const}} + k_{D_{var}} \cdot q(t)$ согласно уравнениям (7) и (8). Динамика $k_D(t)$ указывает на диссипативные потери в антенне ФСII путем распада $^1Chl^*$ (рис. 3 и формула (5)) и может быть объяснена быстрой фазой NPQ тушения (в интервале ~ 1–2 мин) в ответ на освещение образца после темновой адаптации [6, 35–37, 42]. Эту компоненту NPQ обычно обозначают как энергозависимое qE-тушение, вызванное снижением люменальной рН.

Действительно, график $k_{D_{Ant}}$ (рис. 8а) указывает на низкий уровень диссипации энергии в антенне в соответствии с базовой величиной $k_{D_{const}} = 3 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$, неизменной в интервале $t < 10$ с после темновой адаптации образца. Для микроводоросли *Scenedesmus*, величина $k_{D_{const}}$ не зависит от интенсивности света (табл. 3). Параметр $k_{D_{var}}$ в формулах (7) и (8) определяет максимальный уровень потерь энергии в антенне согласно $k_{D_{var}} = 3.8 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ или $1.2 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ в зависимости от сильной или средней интенсивности света (табл. 1, столбцы 60% или 40%). В интервале $t > 10$ с динамика закисления люмена до значения

$pH_L|_{Trigg} = 6.7$ коррелирует с возрастанием qE-тушения в расчетах не только для 60%-го (рис. 8а, траектории pH_L , k_{D-qE}), но и для 40%-го освещения (не показано).

Динамика линейного и циклического переноса электронов при действии света. Как известно, поглощение фотона и экситонное возбуждение $^1Chl^*$ -антенн в светозахватывающих белковых комплексах приводит к переносу энергии в РЦ и разделению зарядов в ФСII на временах 10^{-11} – 10^{-8} с. Стабилизация электрона на $Q_A^{-1}(Chl-P680)^*Phe \leftrightarrow Phe^-P680^+Q_A \rightarrow PheP680^{(+)}Q_A^-$ (за ~300 пс) и последующий перенос $Q_A^{-1} \rightarrow Q_B^{(0)}$ (за сотни микросекунд) приводят к накоплению закрытых РЦ (рис. 8б, траектория ΣQ_A^-). Последующее замедление оттока электронов от ФСII происходит при обмене молекул PQH_2 на PQ при диффузии PQH_2 от стромальной стороны мембраны к люменальной (рис. 8б, PQH_{2S} и PQH_{2L}) и при транспорте электронов $PQH_2 \rightarrow Cyt\ b_6f \rightarrow PC \rightarrow FCI$. Фотохимическое разделение зарядов и закрытие РЦ ФСII происходит всегда быстрее последующего «открытия РЦ» и оттока электронов от PQH_2 в интервале времени 10^{-3} с.

Генерация возбуждения $^1(Chl-P680)^*$ определяется световой константой k_L , значение которой зависит от сечения поглощения фотонов фотосистемой II и интенсивности света [30]. Фитирование модельных кривых ИФ при увеличении k_L от 560 до 840 с^{-1} показало возрастание амплитуды сигнала ИФ (FL2 и FL1, рис. 5а) и ускорение стадий OABCD окисления–восстановления P700 (P_{7002} и P_{7001} , рис. 5а). «Давление возбуждения» на систему преобразования энергии света может привести к разрушению целостности компонент ЭТЦ за счет избытка электронов и появления активных форм кислорода. На схеме модели ТМ (рис. 1) процесс, обозначенный знаком \oplus , соответствует предотвращению действия избыточного возбуждения за счет процесса qE-тушения при энергизации мембраны тилакоида.

Фитирование параметров в формуле (8) (см. раздел «qE-тушение») показало, что при увеличении световой константы k_L в полтора раза (от 560 до 840 с^{-1}) константа $k_{D_{var}}$ усиленной диссипации энергии в этих условиях возрастает в три раза, $k_{D_{var}} = 1.2 \cdot 10^8$ и $3.8 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ (табл. 1). Иными словами, усиление распада $^1Chl^*$ под влиянием qE-тушения ($k_{D_{Ant}}$, рис. 8а) обеспечивает защиту системы ТМ в антенных комплексах ФСII в ответ на увеличение k_L . Моделирование показывает, что при действии постоянного света энергозави-

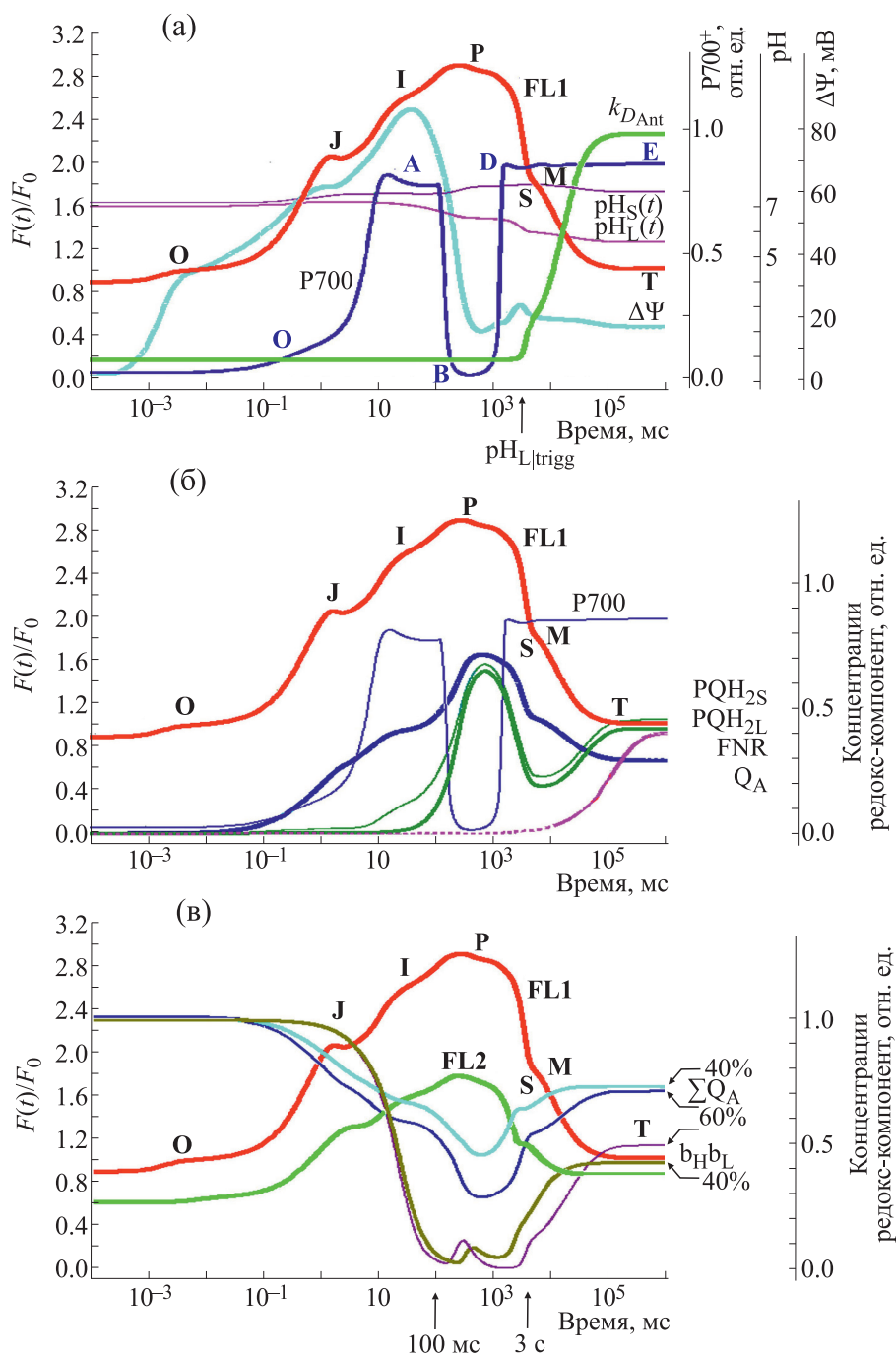


Рис. 8. Динамика компонент системы тилакоидных мембран, моделируемая для микроводоросли *Scenedesmus obliquus*. Траектории FL1 и P700 – расчет индукции флуоресценции, фитированной по ИФ клеток *Scenedesmus* (рис. 5а, ФЛ1) и редокс-превращений P700 ФСII (рис. 5б, FL1, P700-60%). (а) – Стадии энергизации мембраны связаны с изменениями pH люмена $pH_L(t)$, pH стромы $pH_S(t)$ и электрического потенциала $\Delta\Psi(t)$. Изменения динамической константы скорости диссипации энергии в антенне ФСII представлены графиком k_{DAnt} (формула (8) для $k_D(t)$), выявляют запуск qE-тушения при закислении люмена до $pH_{L|trigg} = 6.7$. (б) – Рассчитаны: ΣQ_A^- – закрытые формы РЦ ФСII с Q_A^- , PQH_{2S} и PQH_{2L} – степень восстановленности пула хинолов на стромальной и люменальной сторонах мембраны, FNR – динамическая константа скорости активации FNR-редуктазы $k_{FNR}(t)$ (формула (9)). (в) – Концентрации редокс-компонент рассчитаны на основе фитирования модели ТМ для освещенности 60% и 40% (см. рис. 5б). Динамика открытых РЦ ФСII (ΣQ_A -60% и ΣQ_A -40%) определяет фотохимическое qP-тушение. Графики $b_{L/H}$ -60% и $b_{L/H}$ -40% – расчет состояний S_{yt} *bf* без электронов на b_L - и b_H -гемах. Стрелками выделен интервал времени $100\text{ мс} < t < 3\text{ с}$, в котором отличия $b_{L/H}$ -60% и $b_{L/H}$ -40% указывают на роль комплекса *Syt bf* в световой адаптации системы ТМ.

симое qE-тушение включается в интервале $1 \text{ с} < t < 10 \text{ с}$ и возрастает до максимума в интервале $10 \text{ с} > t < 100 \text{ с}$ (k_{DAnt} , рис. 8а), усиливая спад интенсивности флуоресценции на медленной PSMT-стадии ИФ на фоне энергизации мембраны (график FL1, рис. 8а).

Индукцированные светом ЛПЭ и ЦПЭ (схема 1, рис. 1) дают вклад в формирование трансмембранного градиента протонов. Перенос электронов от Fd^{I} в стромальный сайт $\text{Cyt } b_f$ с последующим окислением PQH_2 и восстановлением PC в люменальном сайте формирует ЦПЭ вокруг ФCI, обеспечивая генерацию АТФ без продуцирования NADPH.

Известно [6, 40], что при активации стромальных метаболических циклов на кривой ИФ появляется фаза SM. Действительно, в нашей модели ТМ при фитировании ИФ *in vivo*, до 100 с после темновой адаптации, выявляется процесс световой активации FNR-редуктазы на стадии SM-фазы (график FNR, рис. 8б) при соотношении АТФ:NADPH = 1.52:1 в стационарном состоянии. Этот результат совпадает с литературными данными [6, 10] о таком же соотношении метаболитов (АТФ/NADPH = 1.5) при оптимальном режиме работы стромальных циклов.

Роль цитохромного комплекса b_6f в переносе электронов. Роль цитохромного комплекса $\text{Cyt } b_6f$ на стадиях переноса электронов между ФCII и ФCI анализировалась на основе фитирования траекторий (FL1 и FL2, рис. 5б) на временах от микросекунд до 100 с по измерениям кривых ИФ на клетках *Scenedesmus* (точки ФЛ1-60% и ФЛ2-40%, рис. 5а).

В условиях темновой адаптации гемы $b_L b_H$ комплексов $\text{Cyt } b_f$ нейтральны и не заполнены электронами (модель ТМ, рис. 1 и 2а, компонента fl). В переходах «темнота–свет» динамика процессов с участием подсистем ФCII, пул PQ/PQH_2 , $\text{Cyt } b_f$, ФCI (рис. 8б) связана с динамикой редокс-состояния гемов $b_L b_H$ ($b_{L/H}$), рассчитанной при $k_L = 560$ и 840 с^{-1} на рис. 8в.

На временах до $t < \sim 10 \text{ мс}$ степень восстановления гемов за счет ЦПЭ не зависит от k_L (рис. 8в, траектории $b_{L/H1}$ и $b_{L/H2}$). В интервале до 100 мс, согласно результатам вычислений, быстрые кинетические стадии ИФ (ОЛ) и изменений P700 катион-радикала (OAB) связаны с увеличением доли РЦ ФCII с Q_A^- и окислением P700 (рис. 8б, ΣQ_A^- и P700^+) в условиях независимой работы каждой из фотосистем – ФCII и ФCI.

В интервале $100 \text{ мс} < t < 3 \text{ с}$ степень восстановления $\text{Cyt } b_f$ максимальна, что отражает очередное заполнение компонент ЭТЦ электронами.

(1) Восстановление P700 на стадии «В» паттерна OABCDE P700 (рис. 8б) происходит в процессе ЦПЭ из пула Fd^{I} (схема 1, раздел «Структура модели ТМ»). (2) Формирование пула PQH_2 происходит параллельно с накоплением закрытых РЦ ФCII (рис. 8б). При этом восстановленные на стромальной стороне мембраны молекулы PQH_2 диффундируют (траектории PQH_{2S} и PQH_{2L} , рис. 8б) к люменальному сайту $\text{Cyt } b_f$.

Согласно вычислениям с $k_L = 560$ и 840 с^{-1} (траектории ΣQ_A -40% и ΣQ_A -60%, рис. 8в), фотохимическое тушение в ФCII определяется количеством открытых РЦ (ΣQ_A). Очевидно, что при световой индукции накопление закрытых РЦ (с Q_A^-) достигает 65% при освещении 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ и 54% степени восстановленности РЦ при 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Максимальная восстановленность гемов $b_{L/H}$ поддерживается на более длительном интервале времени до 3 с при $k_L = 840 \text{ с}^{-1}$ по сравнению с интервалом до 1 с при 560 с^{-1} ($b_{L/H1}$ -60% и $b_{L/H2}$ -40%, рис. 8в). Этому сопутствует снижение фотохимического тушения при усилении освещения (ΣQ_A 60% в сравнении с ΣQ_A 40%).

Согласно расчетам при $k_L = 840 \text{ с}^{-1}$ превышение скорости ЛПЭ над ЦПЭ достигается за время около 1 с (здесь не показано) на начальной стадии активации FNR-редуктазы (траектория FNR, рис. 8б). Последующее усиление ЛПЭ ведет к снятию блокировки оттока электронов на стромальной стороне ФCI. Вслед за тем вторичное окисление P700 на стадиях CDE паттерна OABCDE редокс-превращений P700 (P700, 8б) и терминальное восстановление пула PQH_2 (PQH_2 , рис. 8б) достигают стационарного уровня в интервале 1–2 мин, когда переходы ФCII → PQ/PQH₂ → $\text{Cyt } b_6f$ → PC → ФCI взаимно согласованы при световой активации FNR-редуктазы (FNR, рис. 8б).

В целом на стадии заполнения гемов $b_{L/H}$ электронами обеспечивается согласование процессов в ФCII и ФCI в течение интервала времени $100 \text{ мс} < t < 2 \text{ с}$ и одновременное формирование на этом этапе максимумов восстановленности РЦ ФCII, хинолов PQH_2 , РЦ ФCI.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация системы тилакоидных мембран к режиму освещения сопровождается индукционными сигналами ФЛ Chl a и изменениями поглощения P700. В данной работе измерения ИФ микроводоросли *Scenedesmus* проводили на временах до 10 мин при плотности потока квантов

света 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (высокая и умеренная интенсивности). Фитирование модели ТМ по данным ИФ клеток *Scenedesmus* позволило получить количественное совпадение модельных траекторий ИФ (FL1-60% и FL2-40%, рис. 5б) и детектируемых в опытах сигналов ОЛПСМТ (ФЛ1 и ФЛ2, рис. 5а) на временах до 100 с на быстрых (ОЛР) и медленных (PSMT) стадиях. Динамика изменения переменных в модели ТМ, рассчитанная до $t < 2$ мин, соответствует (рис. 8а–в) изменениям компонент системы ТМ в ответ на поглощение света в антенне ФСII и ФСI.

На свету происходит генерация состояний $\text{Phe}^- \text{P680}^+$ и $\text{Q}_A^- \text{P680}^+$ с разделенными зарядами, что сопровождается их рекомбинацией с константами скоростей k_{42-45} и k_{46-49} (табл. 1) и потерями энергии, запасенной в фотохимическом процессе. В расчетах обнаружено увеличение констант скоростей рекомбинации зарядов в РЦ с восстановленным вторичным хиноном Q_B -сайта (Q_B^- , Q_BH^-), что может быть связано с влиянием локальных электрических полей [52, 53]. Адаптация системы тилакоидных мембран к освещению отражается в динамике процессов в закрытых и открытых РЦ ФСII, восстановления/окисления пула PQ/PQH_2 и кофактора P700 РЦ ФСI. Это влияет на характер модельных траекторий ΣQ_A^- и ΣQ_A , PQH_2 , P700^+ на рис 8б, построенных по данным ИФ клеток *Scenedesmus*.

Стадии эволюции состояния системы ТМ в интервале времени $t < 2-3$ с связаны с генерацией трансмембранной разности $\Delta\text{pH}_{\text{O}_2}(t) = \text{pH}_S(t) - \text{pH}_L(t)$ (рис. 8а) и реализуются в регуляторной перестройке процессов ТМ, как показано *in silico* на рис. 8а–в.

При освещении поступление протонов в люмен при $\text{pH}_L|_{\text{Trigg}} = 6.7$ инициирует энергозависимое qE-тушение (k_{DAnt} , рис. 8а), максимально возрастающее в интервале $10 \text{ с} > t < 100 \text{ с}$. В результате pH-зависимой регуляции возбуждения в антенне (раздел «Структура модели», формула (8)) происходит снижение интенсивности ФЛ на медленной PSMT-стадии ИФ при согласовании фотохимического qP-тушения с оттоком электронов из системы ТМ.

Такое согласование отражается в характере терминального окисления P700 на стадии «Е» паттерна OABSCDE P700^+ , когда происходит снятие блокировки оттока электронов на стромальной стороне ФСI при активации на свету неактивной в темноте FNR-редуктазы, (траектории P700^+ и FNR, рис. 8б). Таким образом, усиление оттока электронов от Fd^I в реакции ЛПЭ $\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$ становится зави-

симым от константы скорости $k_{\text{FNR}}(t)$ (раздел «Структура модели», формула (9)).

В целом теоретический анализ индуцированных процессов в тилакоидных мембранах клеток *Scenedesmus* показывает, что стационарные редокс-состояния компонент ЭТЦ определены взаимным согласованием потоков ЛПЭ и ЦПЭ на временах от пикосекунд до 1–2 мин в условиях активации FNR-редуктазы и qE-тушения.

В данной работе результаты моделирования сигнала ИФ, детектируемой до 2 с на культуре *Chlorella*, позволили оценить предел времени, в котором достигается фитирование данных по ИФ с применением модели изолированной ФСII либо модели ТМ. Применение модели ФСII при обработке сигналов ИФ, измеренных до 1 с на пробах фитопланктона, позволило получить параметры реакций РЦ ФСII фитоценозов для каждого из трех водоемов – экологически полноценного, цветущего, деградирующего. Отличия кривых ИФ, наблюдаемых для фитоценозов, связаны с разницей в величинах малого набора параметров, которые нами предложено использовать в качестве характеристик (маркеров) состояния фитоценозов природных водоемов.

С целью анализа механизмов процессов, стоящих за отличиями сигналов ИФ необходимо исследовать монокультуры микроводорослей в контролируемых лабораторных условиях, используя данные, полученные при длительной, до минут, световой индукции образцов окисленного фотосинтеза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим сотрудницу кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова к.б.н. Е.В. Воронову за предоставление образцов микроводоросли *Scenedesmus obliquus*. Мы благодарны также проф. С.И. Погосяну за полезные обсуждения и к.б.н. С. С. Хрущеву за техническую поддержку работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121032500060-0 и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00465), а также Российского научного фонда (проект № 22-11-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, R. Steffen, et al., *Photosynth. Res.*, **98**, 105 (2008).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Photosynth. Res.*, **125**, 123 (2015).
- N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, K. E. Klementiev, et al., *Photosynth. Res.*, **146** (1), 259 (2020).
- A. Stirbet and Govindjee, *Photosynth. Res.*, **113**, 15 (2012).
- A. Stirbet D. Lazár, G. C. Papageorgiou, and Govindjee, In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, Ed. by A. K. Mishra, D. N. Tiwari, and A. N. Rai (Acad. Press, Elsevier, 2019), pp. 79–130.
- A. N. Tikhonov, *Photosynth. Res.*, **125**, 65 (2015). DOI: 10.1007/s11120-015-0094-0
- Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 19), Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004).
- A. Н. Шаров, Дисс. ... д-ра биол. наук (Санкт-Петербургский науч.-исслед. центр экологической безопасности РАН, 2020).
- Н. Ф. Реймерс, *Экология. Теории, законы, правила, принципы и гипотезы* («Россия молодая», М., 1994).
- C. R. Ireland, S. P. Long, and N. R. Baker, *Planta*, **160**, 550 (1984)
- G. H. Schatz, H. Brock, and A. R. Holzwarth, *Biophys. J.*, **54**, 397 (1988)
- T. A. Roelofs, C. H. Lee, and A. R. Holzwarth, *Biophys. J.*, **61**, 1147 (1992)
- J. M. Bowes and A. R. Crofts, *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 373 (1980)
- R. J. Strasser, A. Srivastava, and Govindjee, *Photochem. Photobiol.*, **61**, 32 (1995)
- G. Renger and A. Schulze, *Photobiochem. Photobiophys.*, **9**, 79 (1985)
- E. Baake and J. P. Schlöder, *Bull. Math. Biol.*, **54**, 999 (1992)
- A. Stirbet, Govindjee, B. J. Strasser, and R. J. Strasser, *J. Theor. Biol.*, **193**, 131 (1998)
- D. Lazár, *J. Theor. Biol.*, **220**, 469 (2003)
- D. Lazár, *Photosynthetica*, **47** (4), 483 (2009)
- Г. В. Лебедева, Н. Е. Беляева, О. В. Демин и др., *Биофизика*, **47**, 1044 (2002).
- R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, In *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 19), Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 321–362.
- A. А. Волгушева, О. В. Яковлева, Г. П. Кукарских и др., *Биофизика*, **56** (1) 105 (2011).
- A. Stirbet, D. Lazár, J. Kromdijk, and Govindjee, *Photosynthetica*, **56**, 86 (2018).
- N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, G. Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin, *Photosynth. Res.*, **130**, 491 (2016).
- N. Belyaeva, A. Bulychev, G. Riznichenko, and A. Rubin, *Photosynth. Res.*, **140**, 1 (2019).
- G. Riznichenko, G. Lebedeva, O. Demin, and A. Rubin, *J. Biol. Phys.*, **25**, 177 (1999).
- G. V. Lebedeva, N. E. Beljaeva, G. Yu. Riznichenko, and O. V. Demin, in *BioThermoKinetics in the Post Genomic Era*, Ed. by C. Larsson, I. Pahlman and L. Gustafsson (Chalmers Reproservice, Goteborg, 1998), pp. 196–199.
- Н. Е. Беляева, Г. В. Лебедева, Г. Ю. Ризниченко и др., В сб. «Математика. Компьютер. Образование» (М., 2000), вып. 7, сс. 606–614.
- Н. Е. Беляева, Г. В. Лебедева и Г. Ю. Ризниченко, В сб. «Математика. Компьютер. Образование» (М., 2003), вып. 10, сс. 263–276.
- Н. Е. Беляева, Дисс. ... к-та физ.-мат. наук (МГУ им. М. В. Ломоносова, М., 2004).
- Н. Е. Беляева, В. З. Пашенко, Г. Ренгер и др., *Биофизика*, **51** (6) 976 (2006).
- N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, G. Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin, *Biophysics*, **56** (3) 464 (2011a).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *BioSystems*, **103** (2), 188 (2011b).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Plant Physiol. Biochem.*, **77**, 49 (2014).
- O. Ebenhöf, G. Fucile, G. Finazzi, et al., *Philos. Trans. R. Soc. B*, **369**, 20130223 (2014).
- A. Stirbet and Govindjee, *Photosynth. Res.*, **130**, 193 (2016).
- A. Laisk, H. Eichelmann, and V. Oja, *Photosynth. Res.*, **90**, 45 (2006).
- A. A. Bulychev, A. A. Cherkashin, E. M. Muronets, and I. V. Elanskaya, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics*, **1859**, 1086 (2018)/
- V. V. Ptushenko, T. V. Zhigalova, O. V. Avercheva, and A. N. Tikhonov, *Photosynth. Res.*, **139**, 509 (2019).
- I. V. Elanskaya, A. A. Bulychev, E. P. Lukashev, and E. M. Muronets, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1862**, 148318 (2021).
- G. C. Papageorgiou, M. Tsimilli-Michael, and K. Stamatidis, *Photosynth. Res.*, **94**, 275 (2007).
- G. Schansker, S. Z. Tóth, and R. J. Strasser, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 787 (2006).
- S. Kodru, T. Malavath, E. Devadasu, et al., *Photosynth. Res.*, **125**, 219 (2015).
- A. Morales, X. Yin, J. Harbinson, et al., *Plant Physiol.*, **176**, 1247 (2018)
- A. Stirbet, D. Lazár, Y. Guo, and Govindjee, *Ann. Botany*, **126**, 511 (2020).
- P. V. Fursova, E. N. Voronova, A. P. Levich, et al., *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* **72** (4), 184 (2017).
- С. И. Погосян, С. В. Гальчук, Ю. В. Казимирко и др., *Вода: химия и экология*, **6**, 34 (2009).

48. G. E. Milanovsky, A. A. Petrova, D. A. Cherepanov, and A. Y. Semenov, *Photosynth. Res.*, **133**, 185 (2017).
49. M. J. Kamali, G. V. Lebedeva, O. V. Demin, et al., *Biophysics*, **49**, 1061 (2004).
50. I. A. Reynolds, E. A. Johnson, and C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6869 (1985).
51. A. A. Bulychev, M. M. Niyazova, and A. B. Rubin, *Biologicheskie Membrany*, **4**, 262 (1987).
52. G. Schansker, S. Z. Toth, A. R. Holzwarth, and G. Garab, *Photosyn. Res.*, **120**, 43 (2014).
53. A. Laisk and V. Oja, *Photosynth. Res.*, **143**, 335 (2020).

Dynamics of *in vivo* Membrane Processes in Algal Thylakoids as Analyzed from Chlorophyll Fluorescence Induction Using the Photosystem II and Thylakoid Models

N.E. Belyaeva*, A.A. Bulychev*, V.Z. Paschenko*, K.E. Klementiev**, P.A. Ermachenko***, I.V. Konyukhov*, G.Yu. Riznichenko*, and A.B. Rubin*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172, China

***New Pipeline Technology Company, ul. Schepkina, 51/4, bld. 1, Moscow, 129110 Russia

The OJPSMT pattern of Chl *a* fluorescence induction (FI) was obtained with microalgae cells *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*) exposed after dark adaptation to moderate and high light intensities (1200 and 1800 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the time range from the microseconds to 10 minutes. The fast and, particularly, slow OJIPS(M)T stages of FI extending up to 100 seconds were quantitatively described by fitting the thylakoid membrane (TM) model. The calculations adequately reproduced the dynamics of P700 oxidoreduction transients. The parameters of the TM processes were determined, and the transients of the TM model variables are shown in calculations. The dynamic stages of redox reactions in the reaction centers (RCs) of the photosystem II (PSII), the PQ/PQH₂ quinone pool, the cytochrome *b₆f* complex (Cyt *b_f*), and P700 of PSI RCs are influenced by the adaptation of the TM system to light. *In silico* analysis revealed the role of the Cyt *b_f* in the regulation of electron fluxes, when b_{L/H} hemes remain in a more reduced state at high light intensity than at moderate illumination in the interval from 100 ms to 3 s. For non-radiative recombination of the separated charges in the RC Phe⁻P680⁺ and Q_A⁻P680⁺, the dependence of the rate constants k_{42-49} on the level of Q_B⁽²⁾⁻ reduction was revealed, together with the dependence of k_{42-49} on the illumination of chloroplasts. Setting the dynamic rate constants $k_{\text{FNR}}(t)$ and $k_{\text{D-qE}}(t)$ allows comparing the generation $\Delta\text{pH}_{\text{O-i}}(t) = \text{pH}_{\text{S}}(t) - \text{pH}_{\text{L}}(t)$, initiation of qE-quenching at $\text{pH}_{\text{L}}|_{\text{Trigg}} = 6.7$, activation in the light FNR — reductase, and reaching the stationary charge flows up to 1–2 minutes of light induction. The fitting model of isolated PSII according to phytoplankton FI signals revealed the similarity of electron transfer parameters in PS2 RCs in monocultures such as *Scenedesmus*, *Chlorella*, and phytoplankton samples. The markers of the phytocenosis condition deviated only in the case of the degradation of a water reservoir compared to an ecologically clean one. These differences in markers consist in the reduced size of the antennas, an enhanced energy dissipation, and the pH decrease in the lumen.

Keywords: photosystems I and II; chlorophyll *a* fluorescence induction; model simulation; electron and proton transfer; nonphotochemical quenching