

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.345

Оценка первичных реакций фотосинтеза в индивидуальных клетках микроводорослей микрофлуориметрическим методом**А.А. Волгушева¹ , И.В. Конюхов¹ , Т.К. Антал^{2,*}** ¹*Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Лаборатория комплексных экологических исследований, Псковский государственный университет, Россия, 180000, г. Псков, пл. Ленина, д. 2***e-mail: taras_an@mail.ru*

Регистрация кривых световой индукции флуоресценции хлорофилла высокого разрешения (т.н. ОЛР-кривых) широко используется для оценки первичных реакций фотосинтеза фототрофных организмов. Современные флуоресцентные методы в совокупности с методами микроскопии предоставляют перспективную возможность регистрации ОЛР-кривых на индивидуальных водорослевых клетках, что позволяет исследовать механизмы адаптации микроводорослей к стрессовым воздействиям, сопровождающиеся реорганизацией структуры популяции. В данной работе мы впервые охарактеризовали ОЛР-кривые, полученные на индивидуальных водорослевых клетках с помощью оригинального микрофлуориметра, и сравнили их с кривыми, снятыми традиционно в суспензиях микроводорослей. По результатам исследования предложены метод анализа ОЛР-кривых индивидуальных клеток микроводорослей, а также пути дальнейшего улучшения микрофлуориметрического метода.

Ключевые слова: фотосинтез, ОЛР-кривые, ЛР-тест, флуоресценция хлорофилла, микрофлуориметрия, микроводоросли

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-4

Введение

Фотосинтетическая активность является одним из ключевых показателей состояния фототрофных микроорганизмов, который широко используется при изучении ответных реакций организма на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Обычно для оценки фотосинтетической активности лабораторных культур микроводорослей или фитопланктонных сообществ используются методы измерения скорости фотообразования кислорода и/или поглощения двуокси углерода [1–3]. Данные методы достаточно трудоемки, особенно в полевых условиях, и требуют дополнительного определения биомассы или содержания хлорофилла (Хл). Поэтому в качестве альтернативы прямым методам получили распространение оптические методы измерения сигнала быстрой флуоресценции хлорофилла (ФХ) [4–5]. Данный подход базируется на способности Хл испускать кванты света (флуоресцировать) во время освещения. При этом выход ФХ связан с эффективностью использования световой энергии в первичных реакциях фотосинтеза, связанных с восстановлением НАДФ⁺

и синтезом АТФ для энергетического обеспечения цикла Кальвина.

Среди наиболее популярных методов измерения ФХ на сегодняшний день – методы РАМ (Pulse Amplitude Modulation, амплитудно-импульсная модуляция) и методы регистрации кинетических кривых световой индукции и темновой релаксации быстрой ФХ высокого разрешения [6–8]. Среди последних наиболее распространен метод регистрации кривой световой индукции ФХ – т.н. ОЛР-кривой, которая отражает, в основном, процесс восстановления фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) на свету высокой интенсивности [9]. Плотность потока фотонов (ППФ) фотосинтетически активной радиации при регистрации ОЛР-кривой обычно не превышает 10 тыс. мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹.

Типичная ОЛР-кривая отражает рост выхода ФХ от минимального значения F₀ (точка О на кривой) в адаптированном к темноте состоянии, когда фотосинтетическая ЭТЦ находится в окисленном состоянии, до максимального уровня F_М (пик Р), когда переносчики электронов переходят в полностью восстановленное состояние. Наличие трех фаз

роста выхода флуоресценции — ОJ (~5–40 мкс — 2–3 мс), JI (2–3 мс — 20–30 мс) и IP (20–30 мс — 100–300 мс) — отражает три последовательных процесса индукции фотосинтетического электронного транспорта. ОJ-фаза (т.н. фотохимическая фаза) зависит от интенсивности возбуждающего света и характеризуется восстановлением акцепторной стороны фотосистемы 2 (ФС2): хинонных акцепторов Q_A и Q_B [10]. Считается, что последующий за точкой J рост выхода ФХ обусловлен дополнительным восстановлением акцепторной стороны ФС2, пула пластохинонов (пул ПХ), увеличением энергизации тилакоидных мембран и конформационными изменениями ФС2 [8, 11, 12].

В последнее время получают распространение методы измерения ФХ, позволяющие оценивать состояние индивидуальных клеток фототрофных микроорганизмов. Это дает возможность активно изучать механизмы адаптации популяции микроводорослей к действию стрессовых факторов за счет реорганизации структуры популяции. Данный адаптационный механизм основан на высокой генетической вариабельности одноклеточных организмов, что позволяет им выживать даже в экстремальных условиях. Ранее для оценки фотосинтетической активности индивидуальных водорослевых клеток было предложено использовать метод РАМ в комбинации с микроскопом [13]. В значительно меньшей степени разработаны методы регистрации ОJIP-кривых на индивидуальных клетках.

Недавно на кафедре биофизики биологического факультета МГУ был разработан микрофлуориметр, позволяющий снимать ОJIP-кривые на индивидуальных клетках микроводорослей [14]. Предложенный авторами анализ ОJIP-кривых основан на определении величины максимальной переменной ФХ (F_V) и базовых показателей первичных реакций фотосинтеза: максимального квантового выхода фотохимического преобразования световой энергии в ФС2 (параметр F_V/F_M) и эффективности фотохимического преобразования световой энергии в ФС2 на актиничном свете (F_V'/F_M'). Данные показатели позволяют определять долю центров ФС2 в клетке, способных к фотохимическому преобразованию энергии. С помощью разработанного метода были выявлены клетки зеленой микроводоросли *Chlorella sorokiniana*, сохраняющие высокую фотохимическую активность и жизнеспособность в присутствии сильного токсиканта, вызывающего гибель до 98% клеток [15].

Многофазная ОJIP-кривая позволяет определять кроме параметров фотохимической активности ФС2 также другие важные параметры фотосинтетического электронного транспорта — в частности, эффективность переноса электрона с ФС2 в пул ПХ [16]. В данной работе мы впервые охарактеризовали ОJIP-кривые, полученные на

индивидуальных клетках зеленых и диатомовых микроводорослей, и предложили оценивать квантовый выход электронного транспорта в ФС2 для более полного анализа первичных реакций фотосинтеза.

Материалы и методы

Культивирование микроводорослей. В качестве объектов исследования использовали культуры зеленых (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii*) и диатомовых (*Gomphonema parvulum*, *Sellaphora* sp.) микроводорослей. Диатомовые водоросли и *S. quadricauda* выращивали на среде BG11 [17]. При выращивании диатомовых водорослей в стандартную среду BG11 дополнительно добавляли $Na_2SiO_3 \times 9H_2O$ в концентрации $0,030 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и витамины B1 и B12 ($5 \cdot 10^{-7} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$). *C. reinhardtii* выращивали на минеральной среде HS [18]. Культуры микроводорослей растили в конических колбах Эрленмейера объемом 100 мл на шейкере при скорости перемешивания 120 об. мин^{-1} и температуре 25°C . Режим освещения составлял 10 ч освещения (ППФ $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и 14 ч темноты. Культуры выращивали в течение 3 сут, финальная концентрация Хл составляла $\sim 3 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Культивирование *C. reinhardtii* на среде без серы. Для создания условий серного голодания клетки *C. reinhardtii*, выращенные на полной среде HS, помещали на среду HS без серы, в которой сульфат был заменен эквимоларным количеством хлорида. Протокол переноса клеток на среду без серы заключался в осаждении культуры путем центрифугирования (3000 г , 5 мин) и последующим ресуспендированием в среде HS без серы. Эту процедуру повторяли три раза. Контрольные клетки осаждали и ресуспендировали в полной среде HS три раза. После этого 10 мл культуры с концентрацией Хл $3\text{--}4 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ помещали в конические колбы Эрленмейера объемом 100 мл и инкубировали в тех же условиях, которые использовались при выращивании культур.

Регистрация и анализ ОJIP-кривых. ОJIP-кривые в суспензии микроводорослей регистрировали с помощью флуориметра «Portable spectral and fluorescence kinetic system» (PSFKS) [15], разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ и в лаборатории комплексных экологических исследований Псковского государственного университета. Источником возбуждения ФХ служил синий свет с максимумом при 445 нм и ППФ $7500 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Перед измерением клетки выдерживали в темноте в течение 3 мин. Индукционную кривую регистрировали в каждом образце с 10 техническими повторностями и последующим усреднением.

Регистрацию ОJIP-кривых на индивидуальных клетках микроводорослей проводили с помощью разработанного на кафедре биофизики био-

логического факультета МГУ микрофлуориметра как описано ранее [14, 15]. Перед измерением в суспензионную культуру микроводорослей добавляли 0,3% спирта для обездвиживания клеток, адаптировали их 3 мин к темноте, а затем помещали в камеру Горяева. На одной клетке снимали 10 индукционных кривых. Для анализа ОИР-кривых использовали параметры JIP-теста [16] приведенные в табл. 1.

Результаты

На рис. 1 приведены нормированные ОИР-кривые, полученные в суспензиях и на индивидуальных клетках зеленых микроводорослей *S. quadricauda* (рис. 1А) и *C. reinhardtii* (рис. 1Б) и диатомовых микроводорослей *G. parvulum* (рис. 1В) и *Sellaphora* sp. (рис. 1Г). Из рисунка видно, что форма кривых в суспензиях и на клетках

Таблица 1

Список параметров флуоресценции, а также формул используемых в JIP-тесте и объяснения к ним [16]

Измеряемые параметры флуоресценции	
F_0	Интенсивность ФХ при 50 мкс
F_J	Интенсивность ФХ при 2 мс
F_I	Интенсивность ФХ при 20 мс
$F_P(=F_M)$	Максимальный выход ФХ
Параметры JIP-теста	
$F_V = F_M - F_0$	Максимальная переменная ФХ
$V_J = (F_J - F_0) / F_V$	Относительная амплитуда фазы O-J
$V_I = (F_I - F_J) / F_V$	Относительная амплитуда фазы J-I
$TR_O / ABS = F_V / F_M = (F_M - F_0) / F_M$	Максимальный квантовый выход фотохимического преобразования энергии в ФС2
$1 - V_J = 1 - ((F_J - F_0) / F_V)$	Эффективность переноса электрона с ФС2 в пул ПХ
$ET_o / ABS = (F_V / F_M) \times (1 - V_J)$	Максимальный квантовый выход электронного транспорта в ФС2.

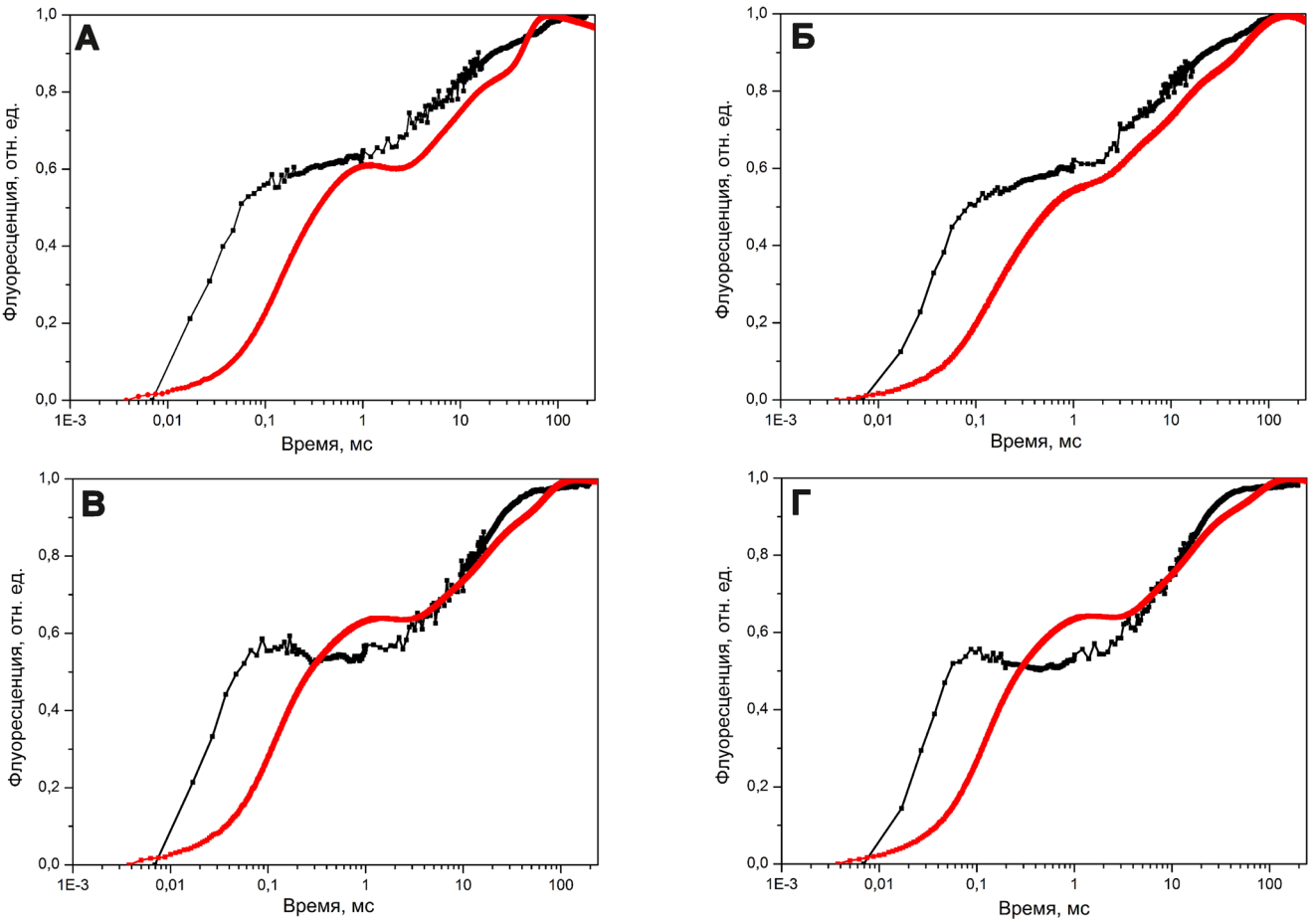


Рис. 1. ОИР-кривые, измеренные в клеточных суспензиях (красный цвет) и на индивидуальных клетках (черный цвет) зеленых микроводорослей – *S. quadricauda* (А), *C. reinhardtii* (Б) и диатомовых микроводорослей – *G. parvulum* (В) и *Sellaphora* sp. (Г). Кривые нормированы на максимальную величину переменной ФХ (амплитуда ОИР).

в целом соответствует типичной для микроводорослей ОЛР-кривой, выявляя основные стадии роста выхода ФХ. Для удобства сравнения кривых их нормировали на величину максимальной переменной ФХ (F_v). Основным отличием кривых у индивидуальных клеток являлось наличие более быстрого начального роста выхода ФХ (фаза ОJ), чем у кривых, полученных для суспензий. Это достигалось за счет отсутствия лаг-фазы, предшествующей быстрому нарастанию ФХ. Более того, на ОЛР-кривых у индивидуальных клеток диатомовых водорослей визуально не проявлялась точка перегиба I и, соответственно, фаза IP. Необходимо отметить, что фаза IP также была подавлена на кривых ОЛР у индивидуальных клеток зеленых водорослей.

В табл. 2 приведены рассчитанные с помощью ОЛР-кривых, показанных на рис. 1, значения F_v/F_m , $(1-V_j)$ и ETo/ABS. Результаты, полученные на индивидуальных клетках четырех культур микроводорослей, характеризовались заниженными (на 10–15%) значениями F_v/F_m по сравнению с этими показателями для суспензий. В то же время величина параметра $1-V_j$ была примерно на 20% выше у индивидуальных клеток диатомовых водорослей по сравнению с суспензиями. Величина ETo/ABS составила у зеленых микроводорос-

лей 0,25 (*S. quadricauda*) и 0,29 (*C. reinhardtii*) у индивидуальных клеток, 0,29 (*S. quadricauda*) и 0,33 (*C. reinhardtii*) – в суспензиях. У диатомовых микроводорослей величина ETo/ABS составила 0,27 (*G. parvulum*) и 0,29 (*Sellaphora* sp.) у индивидуальных клеток. Сравнимые значения получили при измерениях в суспензиях: 0,26 (*G. parvulum*) и 0,27 (*Sellaphora* sp.).

В табл. 2 также показано влияние 24-часовой инкубации культуры *C. reinhardtii* на среде без серы на параметры ФХ. Стрессовое воздействие индуцировало снижение параметров ФХ F_v/F_m и $1-V_j$ на 17% и 16% соответственно (при измерениях в суспензиях), на 22% и 15% соответственно (при измерениях на индивидуальных клетках). Квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (ETo/ABS) снижался на 32% и 30% при измерениях в суспензиях клеток и на индивидуальных клетках соответственно.

Регистрация ОЛР-кривых в репрезентативной выборке индивидуальных клеток (не менее 100 клеток в каждой культуре) позволила получить распределение значений F_v/F_m и $1-V_j$ в популяциях контрольной и голодающей по сере культуры *C. reinhardtii* (рис. 2). В контроле примерно 70% клеток характеризовались высокими значениями F_v/F_m в интервале от 0,6 до 0,7, а оставшаяся

Таблица 2

Параметры ЛР-теста, рассчитанные на основе данных флуоресценции, полученных из ОЛР-кривых, приведенных на рис. 1

Культура	Индивидуальные клетки			Суспензии клеток		
	F_v/F_m	$1-V_j$	ETo/ABS	F_v/F_m	$1-V_j$	ETo/ABS
<i>S. quadricauda</i>	0,66 ± 0,08	0,37 ± 0,10	0,25 ± 0,08	0,73 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,29 ± 0,02
<i>C. reinhardtii</i>	0,65 ± 0,06	0,43 ± 0,05	0,28 ± 0,05	0,77 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,33 ± 0,01
<i>C. reinhardtii</i> (-S)*	0,51 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,19 ± 0,09	0,64 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,23 ± 0,01
<i>G. parvulum</i>	0,65 ± 0,09	0,43 ± 0,06	0,27 ± 0,04	0,76 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,26 ± 0,01
<i>Sellaphora</i> sp.	0,67 ± 0,07	0,44 ± 0,06	0,29 ± 0,04	0,76 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,27 ± 0,03

Примечание: *(-S) – культуры *C. reinhardtii* инкубировали 24 ч на среде без серы

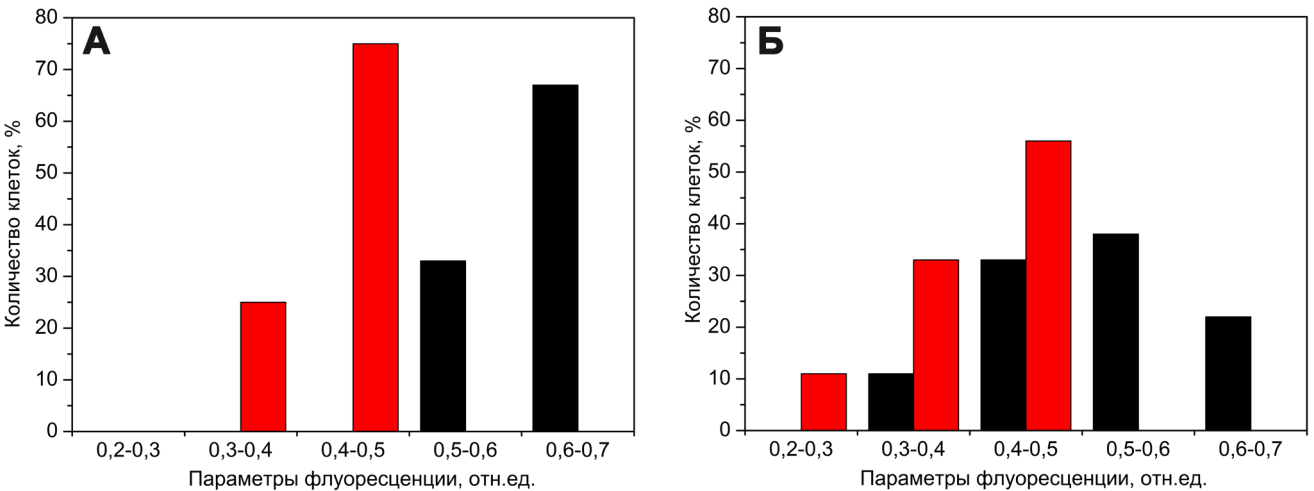


Рис. 2. Распределение параметров ФХ F_v/F_m (черный цвет) и $1-V_j$ (красный цвет) в контрольной культуре *C. reinhardtii* (А) и через 24 ч инкубации без серы (Б). Параметры рассчитаны на основе данных флуоресценции полученных из ОЛР-кривых, снятых на индивидуальных клетках с помощью микрофлуориметра. Выборка для каждой культуры составляла не менее 100 клеток.

часть клеток — значениями в интервале 0,5–0,6. Распределение $1-V_j$ в контрольной культуре носило сходный характер: большая часть клеток (около 75%) характеризовалась высокими значениями в интервале 0,4–0,5, а оставшиеся клетки — значениями в интервале 0,3–0,4. Дефицит серы в среде индуцировал появление дополнительных фракций клеток с низкими значениями этих параметров. Так, доля фракции с высокими значениями F_v/F_m (0,6–0,7) снижалась с 70% в контроле до 20% в голодающих клетках, а доля фракции со значениями F_v/F_m от 0,5 до 0,6 возрастала с 30% до 36%. Доли новых фракций с низкими значениями F_v/F_m составляли 34% в интервале 0,4–0,5 и 10% в интервале 0,3–0,4. Влияние дефицита серы на распределение параметра $1-V_j$ было менее выражено по сравнению с влиянием на F_v/F_m . Так, около 60% голодающих клеток сохраняли значения $1-V_j$ выше 0,4, 33% клеток характеризовались значениями от 0,3 до 0,4, а 10% клеток — от 0,2 до 0,3.

Обсуждение

На сегодняшний день в литературе отсутствует описание ОЛР-кривых, полученных у индивидуальных водорослевых клеток. Проведенное нами сравнение ОЛР-кривых у индивидуальных клеток и в клеточных суспензиях зеленых и диатомовых микроводорослей обнаружило ряд особенностей формы кривых у индивидуальных клеток, которые определялись, прежде всего, различиями в интенсивности возбуждающего света в двух используемых флуориметрах. Так, измерения в суспензиях проводились при максимально возможной для прибора PSFKS интенсивности света — ППФ 7500 мкмоль фотонов $m^{-2} \cdot s^{-1}$, в то время как в микрофлуориметре ППФ была в два раза выше: 15000 мкмоль фотонов $m^{-2} \cdot s^{-1}$. Столь высокая интенсивность света необходима для увеличения общего выхода ФХ и, соответственно, снижения шума, возникающего из-за низкого сигнала от отдельной клетки.

Высокая интенсивность возбуждающего света в микрофлуориметре являлась наиболее вероятной причиной занижения выхода переменной ФХ при измерениях на индивидуальных клетках и занижения величины F_v/F_m на 10–15% по сравнению с результатами измерений в суспензиях клеток (табл. 2). Данный эффект может быть обусловлен быстрым развитием нефотохимического тушения в результате высокой энергизации тилакоидных мембран, приводящего к занижению выхода ФХ, особенно во время последней стадии IP. Действительно, на ОЛР-кривых у индивидуальных клеток зеленых микроводорослей фаза IP была подавлена, а у диатомовых микроводорослей не проявлялась совсем (рис. 1). В пользу того, что причиной подавления фазы IP может быть нефотохимическое тушение, говорит тот факт, что

у некоторых диатомовых микроводорослей, обладающих интенсивным нефотохимическим тушением, практически отсутствует фаза IP при измерениях в суспензии клеток. Однако она проявляется после обработки культуры ионофором валиномицином [19].

Известно, что скорость роста ФХ во время фазы OJ зависит от интенсивности возбуждающего света [9]. При регистрации ОЛР-кривых на индивидуальных клетках быстрый рост ФХ начинался всего через 7–8 мкс после начала освещения, и фаза OJ имела экспоненциальную форму, в то время как при измерениях в суспензиях быстрый рост ФХ наблюдался через 40–50 мкс после начала освещения, при этом фаза OJ характеризовалась сигмоидной формой (рис. 1). Данное наблюдение подтверждает предположение о существенном влиянии фактора интенсивности возбуждающего света на форму кривых ОЛР у индивидуальных клеток.

В гидробиологических и экологических исследованиях флуоресцентные методы обычно используются для определения базовой характеристики фотосинтеза — максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС2 (F_v/F_m) [4, 5, 20, 21]. Данная характеристика отражает самый первый этап конверсии энергии экситона в антенне ФС2 в энергию разделенных зарядов $P_{680}^+Q_A^-$. Последующим важнейшим этапом фотосинтеза является перенос электрона с ФС2 в пул ПХ. Этот процесс зависит от функционального состояния кислород-выделяющего комплекса и акцепторной стороны ФС2, на которое оказывают влияние стрессовые факторы [22, 23]. Необходимо отметить, что ингибирование акцепторной стороны ФС2 — например, диуроном — приводит к полной блокировке фотосинтетического электронного транспорта и фотосинтеза в целом, при этом величина F_v/F_m практически не изменяется. В связи с этим на практике возможны ситуации — в частности, при загрязнении природных водоемов гербицидами — когда наблюдаемые значения F_v/F_m у фитопланктона не позволяют выявить ингибирование фотосинтеза.

Ранее Р. Штрассер предложил метод анализа ОЛР-кривых (JIP-тест) на базе модели, допускающей, что форма кривой отражает трехстадийный процесс восстановления Q_A в ФС2 [16]. В настоящее время предложенная модель является весьма популярной, хотя и подвергается справедливой критике, поскольку в ней не учитывается влияние на выход ФХ электрохимического потенциала на тилакоидной мембране и конформационных изменений в ФС2 [11, 12]. Тем не менее, ключевые параметры JIP-теста находят эмпирическое подтверждение. Одним из таких параметров является $1-V_j$, который отражает эффективность переноса электрона с Q_A в пул ПХ. Данный параметр характеризуется высокой чувствительностью к воздействиям, влияющим на электронный транспорт на

донорной и акцепторной стороне ФС2 [16]. Параметры $1-V_j$ и F_v/F_m позволяют определить квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (ЕТо/ABS), который характеризует конверсию экситона в антенне ФС2 в электрон, перенесенный в пул ПХ. Значения ЕТо/ABS варьировали в диапазоне от 0,25 до 0,29 при измерениях на индивидуальных клетках и от 0,26 до 0,33 при измерениях в суспензиях (табл. 2), указывая на некоторые различия в эффективности первичных реакций фотосинтеза у разных культур микроводорослей и незначительное занижение этого параметра при измерениях на индивидуальных клетках.

Механизмы адаптации микроводорослей к стрессу включают множественные процессы реорганизации метаболических процессов, ультраструктуры клетки и структуры популяции [24, 25]. Обычно для исследования адаптационных процессов оценивают усредненные по культуре физиологические и другие показатели, не учитывая их вариации по популяции. Однако гетерогенность популяции по физиологическим характеристикам может обеспечивать ее восстановление после снижения стрессового давления. Анализ ОЖР-кривых индивидуальных клеток микроводорослей может быть использован для изучения распределения ключевых показателей фотосинтетической активности в популяции микроводорослей в условиях стресса [15].

Дефицит минерального питания является наиболее актуальным стрессом для природного фитопланктона. Влияние недостатка серы на функциональное состояние фотосинтетического аппарата и ОЖР-кривые хорошо изучено в связи со способностью некоторых микроводорослей продуцировать водород [26, 27]. Данный стресс индуцирует множественные изменения фотосинтетического аппарата – в частности, снижение количества фотохимически активных центров ФС2, нарушение линейного электронного транспорта в хлоропласте и быструю инактивацию цикла Кальвина. В данной работе мы изучили влияние дефицита серы на распределение F_v/F_m и $1-V_j$ в культуре *C. reinhardtii*. Стрессовые условия при-

водили к увеличению гетерогенности популяции по данным параметрам, отражая разделение популяции на фракции толерантных и чувствительных к стрессу клеток. Параметры F_v/F_m и $1-V_j$ характеризовались сходным распределением в контроле, однако в условиях дефицита серы проявлялись различия (рис. 2). Так, параметр $1-V_j$ характеризовался более высокой стабильностью в условиях стресса по сравнению с F_v/F_m , поскольку в популяции оставалась существенная доля клеток с высокими, как в контроле, значениями $1-V_j$. Данный результат указывает на то, что снижение активности первичных реакций фотосинтеза в условиях дефицита серы происходило, в основном, в результате снижения содержания фотохимически активных центров ФС2 в клетке, а снижение эффективности электронного транспорта на акцепторной стороне фотохимически активных центров ФС2 было незначительным.

Заключение

Измерение ОЖР-кривых индивидуальных клеток фитопланктона открывает перспективу исследования механизмов реорганизации структуры сообщества фототрофных микроорганизмов для обеспечения выживания в условиях стресса. Для анализа ОЖР-кривых, зарегистрированных на индивидуальных клетках, мы предлагаем использовать эмпирически верифицированные параметры ФХ: F_v/F_m и $1-V_j$, которые позволяют оценить квантовый выход электронного транспорта в ФС2. Дальнейшее улучшение технических качеств представленного в работе микрофлуориметра, прежде всего – повышение чувствительности детектора ФХ и снижение интенсивности возбуждающего света – позволит более точно оценивать активность первичных реакций фотосинтеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-24-00353). Исследования проведены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bender M.L., Grande K.D., Johnson K.M., Marra J.F., Williams P.J., Sieburth J.M., Pilson M.E., Langdon C., Hitchcock G.L., Orchardo J., Hunt C.P., Donaghay P.L., Heinemann K. A comparison of four methods for determining planktonic community production 1. *Limnol. Oceanogr.* 1987;32(5):1085–1098.
2. Kelly C.A., Fee E., Ramlal P.S., Rudd J.W.M., Hesslein R.H., Anema C., and Schindler E.U. Natural variability of carbon dioxide and net epilimnetic production in the surface waters of boreal lakes of different sizes. *Limnol. Oceanogr.* 2001;46(5):1054–1064.
3. del Giorgio P.A., Williams P.J. Respiration in aquatic ecosystems: history and background. *Respiration in Aquatic Ecosystems*. Eds. P.A. del Giorgio and P.J. Williams. N.Y.: Oxford Univ. Press; 2023:1–17.
4. Маторин Д.Н., Горячев С.Н. *Флуоресценция хлорофилла микроводорослей в биотестировании загрязнений*. М.: Альтекс; 2017. 142 с.
5. Погосян С.И., Конюхов И.В., Рубин А.Б. *Проблемы экологической биофизики*. М. – Ижевск: АНО Ижевский институт компьютерных исследований; 2017. 270 с.

6. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 19. Eds. G.C. Papageorgiou and Govindjee. Berlin.: Springer; 2004:279–319.
7. Papageorgiou G.C., Tsimilli-Michael M., Stamatidis K. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynth. Res.* 2007;94(2–3):275–290.
8. Stirbet A., Govindjee Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynth. Res.* 2012; 113(1–3):15–61.
9. Lazár D. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 2006; 33(1):9–30.
10. Schansker G., Tóth S.Z., Kovács L., Holzwarth A.R., Garab G. Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll *a* fluorescence rise. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1807(9):1032–1043.
11. Vredenberg W.J., Bulychiev A. Photoelectric effects on chlorophyll fluorescence of photosystem II *in vivo*. Kinetics in the absence and presence of valinomycin. *Bioelectrochemistry.* 2003;60(1–2):87–95.
12. Sipka G., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J.-R., Lambrev P.H., Garab G. Light-adapted charge-separated state of photosystem II: Structural and functional dynamics of the closed reaction center. *Plant Cell.* 2021;33(4):1286–1302.
13. Murchie E.H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot.* 2013;64(13):3983–98.
14. Kuznetsov A.G., Konyukhov I.V., Pogosyan S.I., Rubin A.B. Microfluorimeter for studying the state of photosynthetic apparatus of individual cells of microalgae. *Oceanology.* 2021;61(6):1055–1063.
15. Volgusheva A.A., Todorenko D.A., Konyukhov I.V., Voronova E.N., Pogosyan S.I., Plyusnina T.Y., Khrushchev S.S., Antal T.K. Acclimation response of green microalgae *Chlorella sorokiniana* to 2,3',4,4',6-pentachlorobiphenyl. *Photochem. Photobiol.* 2022; 99(4):1106–1114.
16. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 19. Eds. G.C. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht.: Springer; 2004:321–362.
17. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M., Stanier R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1979; 111(1):1–61.
18. Harris E.H. *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego: Academic Press; 1989. 780 pp.
19. Antal T.K., Osipov V., Matorin D.N., Rubin A.B. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic reactions in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2011;102(2):169–173.
20. Vanharanta M., Elovaara S., Franklin D.J., Spilling K., Tamelander T. Viability of pico- and nanophytoplankton in the Baltic Sea during spring. *Aquat. Ecol.* 2020;54:119–135.
21. Swoczyna T., Kalaji H.M., Bussotti F., Mojski J., Pollastrini M. Environmental stress – what can we learn from chlorophyll *a* fluorescence analysis in woody plants? A review. *Front. Plant Sci.* 2022;13:1048582.
22. Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I., Cetner M.D., I. Lukasik, Goltsev V. and Ladle R.J. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant.* 2016; 38(4):102.
23. Sasi S., Venkatesh J., Daneshi R.F., Gururani M.A. Photosystem II extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants.* 2018;7(4):100.
24. Behrenfeld M.J., Milligan A.J. Photophysiological expressions of iron stress in phytoplankton. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2013;5:217–246.
25. Van de Waal D.B., Litchman E. Multiple global change stressor effects on phytoplankton nutrient acquisition in a future ocean. *Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2020;375(1798):20190706.
26. Antal T.K., Krendeleva T.E., Tyystjärvi E. Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. *Photosynth. Res.* 2015;125(3):357–381.
27. Петрова Е.В., Кукарских Г.П., Кренделева Т., Антал, Т.К. О механизмах и роли фотосинтетического образования водорода у зеленых микроводорослей. *Микробиол.* 2020;89(3):259–275.

Поступила в редакцию 08.05.2023

После доработки 12.09.2023

Принята в печать 20.09.2023

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the primary reactions of photosynthesis in microalgae single cell by microfluorimetric method

A.A. Volgusheva¹ , I.V. Konyukhov¹ , T.K. Antal^{2, *} 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Laboratory of Integrated Environmental Research, Pskov State University, 21 Sovetskaya st., Pskov, 180000, Russia

*e-mail: taras_an@mail.ru

High-resolution chlorophyll fluorescence light induction curves (OJIP transients) are widely used to assess the primary photosynthetic responses of phototrophic microorganisms. Chlorophyll fluorescence measuring methods coupled with microscopy techniques provide

a promising opportunity to measure OJIP transients on individual algal cells, allowing scientists to investigate stress adaptation mechanisms related to reorganization of microalgae population or phytoplankton community. In this work, we first characterized the OJIP transients measured on individual algae cells using the original microfluorimeter and compared them with OJIP transients recorded in microalgae suspensions. Based on the results of the study, we proposed a method for analyzing OJIP curves of individual microalgae cells as well as ways to further improve microfluorimeters.

Keywords: *photosynthesis, OJIP transient, JIP-test, chlorophyll fluorescence, microfluorimetry, microalgae*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-24-00353.

Сведения об авторах

Волгушева Алена Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: volg-alena@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0414-1236>

Конюхов Иван Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vanka.kon@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7686-461X>

Антал Тарас Корнелиевич — докт. биол. наук, проректор по научной работе ПсковГУ. Тел.: 8-811-220-16-99; e-mail: taras_an@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-1111-2222-4444>