УДК 551.466.6

© *Ф. И. Кузьминов*[1,2], *Е. А. Ширшин*[2], *М. Ю. Горбунов*[1], *В. В. Фадеев*[2]
[1]Отделение изучения морских и прибрежных зон, Университет Ратгерс, Нью Брансвик, США
[2]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия
fedor.kouzminov@rutgers.edu

НОВЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ФОТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЦИАНОБАКТЕРИЙ *IN SITU*

Рассматриваются новые подходы к определению фотофизических и фотофизиологических параметров фотосинтетических организмов, которые могут быть использованы для определения их физиологического состояния *in situ*, количественной оценки эффективности фотосинтеза и первичной продукции. На примере исследования физиологического состояния цианобактерий демонстрируются возможности метода индукции и релаксации флуоресценции и метода нелинейной лазерной флуорометрии. Показаны возможности совместного использования этих методов при исследовании механизмов защиты от избыточного освещения (нефотохимического тушения). В частности, приведены результаты, которые демонстрируют, что хлорофиллсодержащий светособирающий комплекс цианобактерий не принимает непосредственного участия в механизме нефотохимического тушения. Данные по исследованию влияния спектральных характеристик внешнего освещения на физиологическое состояние цианобактерий свидетельствуют о том, что спектральные свойства и интенсивность освещения, при котором выращивались культуры цианобактерий, существенным образом влияют на количество и соотношения фикобилин- и хлорофиллсодержащих комплексов, а также на содержание пигментов в этих комплексах. Эти изменения проявляются в измеряемых фотофизиологических параметрах, что говорит о возможности оценки световых условий, при которых росли клетки цианобактерий in situ при помощи методов флуорометрии.

Ключевые слова: цианобактерии, фотосинтез, флуорометрия, фотоадаптация.

F. I. Kuzminov[1,2], *E. A. Shirshin*[2], *M. Yu. Gorbunov*[1], *V. V. Fadeev*[2]
[1]Department of Marine and Coastal Sciences, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA
[2]M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
fedor.kouzminov@rutgers.edu

NEW OPTICAL APPROACHES IN STUDYING PHOTOPHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF CYANOBACTERIA *IN SITU*

In this work we examine new approaches for measurment of photophysical and photophysiological parameters of photosynthetic organisms that could be used to assess their physiological state, photosynthetic efficiency, and primary productivity. On the example of cyanobacteria, we demonstrate the potential of Fluorescence Induction and Relaxation technique (FIRe) and Non-linear Laser Fluorimetry (NLF) in assessing physiological state of phytoplankton. We apply these methods to study mechanism of high light tolerance (non-photochemical quenching). In particular, we show that chlorophyll-containing light harvesting complex of cyanobacteria does not directly participate in the mechanism of non-photochemical quenching. Studies on the effect of spectral properties on the physiological state of cyanobacteria demonstrate that light induced changes in the content, quantity and ratio of chlorophyll- and phycobilin-containing light harvesting complexes could be determined from measured photophysiological parameters. Thus, FIRe and NLF could be used to assess light growth conditions in situ.

Key words: cyanobacteria, photosynthesis, fluorimetry, photoadaptation.

В последние десятилетия наблюдается увеличение влияния деятельности человека на водные экосистемы как на локальном, так и на глобальном уровнях. Локальные эффекты включают в себя загрязнение прибрежных зон и акваторий водоемов тяжелыми металлами [1], нефтепродуктами [2], сельскохозяйственными удобрениями и т. д. К глобальным эффектам можно отнести вызванный антропогенными факторами рост концентрации углекислого газа и, как следствие, температуры, что приводит к изменению динамических процессов в атмосфере и гидросфере планеты. В частности, изменения в характере океанских течений может привести к перераспределению минеральных питательных веществ в океане и повлиять на динамику в эвтрофном слое (приповерхностном слое, обычно не более нескольких десятков метров, богатом фитопланктоном). В открытом океане за счет изменяющейся облачности и процесса вертикального перемешивания водных масс (в который вовлечен и фитопланктон) количество солнечного излучения доступного для фотосинтеза варьируются в течение дня. В связи с этим в процессе эволюции фотосинтезирующие организмы выработали механизмы адаптации к изменяющимся уровням освещенности. Возможности по адаптации варьируются между различными группами фитопланктона, поэтому любое изменение динамики водных масс в эвтрофном слое приведет к изменению структуры фитопланктонного сообщества, что должно быть предметом подробного изучения и постоянного мониторинга. Принимая во внимание размеры фитопланктонного сообщества в мировом океане, для его (фитопланктонного сообщества) мониторинга необходимо использовать экспрессные и дистанционные методы зондирования. Одним из решений данной проблемы является использование оптических методов оценки физиологического состояния фитопланктона *in situ*, в том числе методы переменной флуоресценции [3, 4] и лазерной флуорометрии [5, 6]. Данные методики позволяют определять широкий набор фотофизических параметров различных светособирающих пигментов и фотофизиологические параметры всего фотосинтезирующего комплекса, что позволяет эффективно использовать их для мониторинга состояния фитопланктонных сообществ.

В работе исследуются оптические методы диагностики для оценки физиологического состояния цианобактерий — одного из древнейших фотосинтезирующих организмов на планете. Цианобактерии обладают широким набором адаптационных механизмов и могут быть более устойчивы к изменениям в окружающей среде по сравнению с другими видами фитопланктона, поэтому в условиях изменяющегося климата возможно возрастание их роли в фитопланктонных сообществах. В связи с этим необходимо уделить особое внимание диагностике физиологического состояния этих организмов. Наличие дополнительных к хлорофиллу-*a* флуоресцирующих пигментов (фикобилинов) существенно расширяет набор определяемых оптическими методами параметров, что увеличивает возможности по мониторингу цианобактерий. В нашей работе мы используем метод нелинейной лазерной флуориметрии [7, 8] совместно с классическими методами переменной флуоресценции для исследования влияния различных стрессоров на физиологию цианобактерий (например, влияние изменения солености [9] или избыточного освещения [8]). В данной статье мы исследуем влияния спектральных характеристик и интенсивности освещения на фотофизические параметры хлорофиллсодержащего светособирающего комплекса цианобактерий.

Материалы и методы

Дикий тип цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 выращивался при температуре 25°C в среде BG-11 в течение 5–7 дней перед проведением экспериментов в инкубаторах с циклом 12/12 (свет/темнота). Использовался свет белых (300 мкЭ·м$^{-2}$·с$^{-1}$), красных (50 и 200 мкЭ·м$^{-2}$·с$^{-1}$) или синих (50 и 200 мкЭ·м$^{-2}$·с$^{-1}$) светодиодов.

Метод индукции и релаксации флуоресценции. Метод индукции и релаксации флуоресценции (Fluorescence Induction and Relaxation technique (FIRe)) [3] основан на регистрации с высоким временным разрешением (масштаб времени от 1 мкс) кривой индукции и последующей релаксации флуоресценции молекул хлорофилла-*a* (Хл-*a*), возбуждаемой короткими импульсами света. Типичный протокол измерения фотофизических параметров с помощью метода FIRe состоит из четырех этапов (рис. 1). На первом этапе для возбуждения флуоресценции используется одиночный мощный импульс света длительностью порядка 100 мкс, переводящий все реакционные центры (РЦ) фотосинтетического аппарата в закрытое состояние. При этом за время импульса интенсивность флуоресценции возрастает от своего минимального значения (F_0) до максимального значения (F_m). На втором этапе длительностью порядка 50 мс регистрируется релаксация флуоресценции, характеризующая постепенное открытие РЦ.

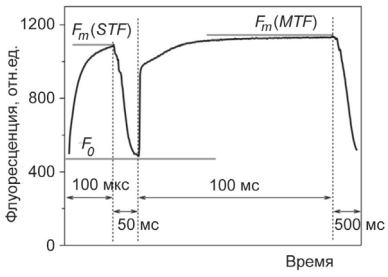

Рис. 1. Характерный экспериментальный протокол в методе индукции и релаксации флуоресценции. F_0 — минимальный уровень флуоресценции; F_m(STF) — максимальный уровень флуоресценции после 100 мкс светового импульса; F_m(MTF) — максимальный уровень флуоресценции после 100 мс светового импульса. (Прим.: шкала времени нелинейная, поэтому на рисунке даны характерные длительности каждого из участков экспериментальной кривой).

На третьем этапе для возбуждения флуоресценции используется длинный импульс света (длительность порядка 100 мс) с высокой средней плотностью мощности, который не только переводит все РЦ в закрытое состояние, но и влияет на ряд других участков цепи миграции зарядов в фотосинтетическом аппарате. На четвертом этапе регистрируется релаксация флуоресценции. Проведение описанного экспериментального протокола на фоне постоянного освещения (в типичных аппаратных реализациях метода FIRe для этого используется мощный синий светодиод, длина волны излучения ~470 нм, плотность потока фотонов в излучении которого меняется в пределах 0–2000 мкЭ·м$^{-2}$·с$^{-1}$) позволяет исследовать механизмы фотоадаптации.

Определенные значения интенсивности флуоресценции, а также время, за которое достигаются максимальные значения F_m и минимальные значения F_0, используются для расчета ряда фотофизических параметров, которые характеризуют функциональное состояние фотосинтетического аппарата. К таким параметрам относятся: переменная флуоресценция $F_V = F_m - F_0$; показатель фотосинтетической активности F_V/F_m, характеризующий относительное количество фотосинтетически активных РЦ, участвующих в разделении зарядов; эффективное сечение фотохимического разделения зарядов ($\sigma_{ФС2}$), характеризующее вероятность поглощения одного фотона в светособирающей антенне и последующего разделения зарядов в реакционном центре; параметр «связанности» (p), характеризующий эффективность миграции энергии между индивидуальными светособирающими комплексами; время релаксации флуоресценции на втором этапе (τ_{Qa}), характеризующее скорость восстановления реакционных центров до открытого состояния, и др.

В качестве источников света в FIRe флуориметре используются мощные светодиоды с длиной волны излучения 450 или 590 нм (ширина полосы излучения по полувысоте — 30 нм), длительностью от 0.5 мкс и пиковой интенсивностью до 1 Вт·см$^{-2}$. Излучение синих светодиодов (450 нм) попадает в коротковолновую полосу поглощения молекул хлорофилла-*a* (полосу Соре). Оранжевые фотодиоды (590 нм) используются для возбуждения пигментов внемембранного светособирающего комплекса — фикобилисомы (ФБС) в цианобактериях. Сигнал флуоресценции регистрируется лавинным фотодиодом и оцифровывается 12-битным АЦП с частотой порядка 5 Мвыборок·с$^{-1}$. Спектральная селекция сигнала флуоресценции осуществляется узкополосным фильтром с максимумом полосы пропускания на длине волны 680 нм (полуширина 20 нм). Небольшая часть возбуждающего излучения направляется отводной пластинкой на PIN-фотодиод реперного канала, используемого для коррекции сигнала на нестабильность мощности излучения светодиода.

Метод нелинейной лазерной флуориметрии. Метод нелинейной лазерной флуориметрии (НЛФ) [5, 10, 11], основан на регистрации нелинейной зависимости числа фотонов флуоресценции N_{fl} от плотности потока фотонов F возбуждающего лазерного излучения — кривой насыщения флуоресценции.

Принципиальной особенностью фотосинтезирующих организмов как объектов флуориметрии является высокая локальная концентрация n_0 молекул флуорофора (Хл-*a*) в пигмент-белковом комплексе фотосинтетической единицы ($n_0 = 10^{19}$–10^{21} см$^{-3}$). По этой причине насыщение флуоресценции при использовании для возбуждения наносекундных лазерных импульсов начинает проявляться уже при низких для таких лазеров значениях плотности потока фотонов $I \approx 10^{20}$ см$^{-2}$·с$^{-1}$ связано, в первую очередь, с синглет-синглетной аннигиляцией возбужденных состояний флуорофоров. При дальнейшем увеличении интенсивности возбуждающего излучения все большую роль в механизме насыщения флуоресценции начинает играть динамическое обеднение их основного состояния. Эти два процесса и определяют форму кривой насыщения флуоресценции ФСО, и описывающие их параметры могут быть, в принципе, определены из экспериментальной кривой насыщения в результате решения соответствующей обратной задачи

с использованием принятой модели формирования флуоресцентного отклика флуорофоров на импульсное лазерного возбуждение.

Для описания формирования флуоресцентного отклика нами используется малопараметрическая модель, описывающая кривую насыщения флуоресценции ФСО как объекта с высокой локальной концентрацией флуорофоров. В модели фигурируют три обобщенных фотофизических параметра: σ — сечение возбуждения молекул Хл-*a*, учитывающее как прямое поглощение света этими молекулами, так и перенос энергии на них с молекул вспомогательных пигментов; τ — эффективное время жизни молекул Хл-*a*, учитывающее все процессы дезактивации возбужденного состояния, кроме синглет-синглетной аннигиляции; $\gamma \cdot n_0$ — максимальная скорость синглет-синглетной аннигиляции (γ — константа скорости, n_0 — локальная концентрация молекул Хл-*a* в фотосинтетической единице).

Для населенности *n* первого возбужденного синглетного состояния молекул Хл-*a* в рамках этой модели можно написать следующее кинетическое уравнение:

$$\frac{dn(t,\vec{r})}{dt} = I(t,\vec{r})\cdot\sigma\cdot\left[n_0 - n(t,\vec{r})\right] - \frac{n(t,\vec{r})}{\tau} - \gamma\cdot n^2(t,\vec{r}). \quad (1)$$

Число фотонов флуоресценции из возбуждаемого объема среды дается выражением:

$$N_{fl} = k_{fl}\cdot\iiint_V d^2\vec{r}dz\int_{-\infty}^{\infty} n(\vec{r},z,t;I)\,dt\ , \quad (2)$$

здесь k_{fl} — скорость излучательного распада возбужденного состояния флуорофора; $n(\vec{r},z,t;I) = n(\vec{r},z,t;I(\vec{r},t),\sigma,\tau,\gamma,n_0)$ — решение уравнения (1); $\vec{r}$ — радиус-вектор в поперечном сечении лазерного пучка; *z* — координата вдоль направления распространения лазерного импульса; *V* — объем, из которого принимается сигнал флуоресценции. Отметим, что зависимостью плотности потока фотонов возбуждающего излучения *I* от координаты *z* можно пренебречь, поскольку в реальном эксперименте концентрация микроводорослей мала, и ослабление лазерного излучения можно не учитывать (приближение оптически тонкого слоя).

В эксперименте, как правило, измеряется зависимость относительного числа фотонов флуоресценции N_{fl} от плотности потока фотонов *I* возбуждающего лазерного излучения. Для перехода к величинам, которые можно измерить в абсолютных единицах, необходимо произвести нормировку числа регистрируемых квантов флуоресценции N_{fl} на некоторый реперный сигнал N_r, линейно зависящий от плотности потока фотонов возбуждающего излучения. В качестве такого реперного сигнала можно использовать излучение самого лазера, направленное отводной пластинкой во второй фотодетектор, а там, где позволяют условия эксперимента, полосу комбинационного рассеяния молекулами основного компонента среды (например, воды). Отношение $\Phi = N_{fl}/N_r$ будем называть флуоресцентным параметром, а зависимость $\Phi^{-1}(I)$ — кривой насыщения флуоресценции. Флуоресцентный параметр в отсутствие насыщения — «ненасыщенный флуоресцентный параметр» (обозначим его как Φ_0) — связан с $\Phi(I)$ очевидной формулой: $\Phi_0 = \lim_{F\to 0}\Phi(I)$.

В работе [10] нами был предложен двухэтапный алгоритм, основанный на априорной информации, которая следует из анализа фотофизических процессов в системах с высокой локальной концентрацией флуорофоров, и позволяющий с достаточно высокой точностью раздельно определять все фотофизические параметры Хл-*a*, фигурирующие в модели (1). Для этого измеряется кривая насыщения флуоресценции с использованием лазерных импульсов длительностью более 10 нс (квазистационарный режим возбуждения), в широком диапазоне изменения значений плотности потока фотонов ($I = 10^{21}$–10^{25} см$^{-2}\cdot$с$^{-1}$).

На начальном участке кривой насыщения (при $I = 10^{21}$–$8\cdot10^{23}$ см$^{-2}\cdot$с$^{-1}$) динамическое обеднение основного состояния выражено слабо, им можно пренебречь и обрабатывать кривую насыщения с использованием квазистационарного приближения по формуле:

$$\Phi^{-1}(I) = \Phi_0^{-1}\left(\alpha_1 + \sqrt{\alpha_2 + \alpha_3 A\cdot I}\right), \quad (3)$$

при этом определяются значения параметров Φ_0 и $A = \sigma\cdot\tau^2\cdot\gamma n_0$ (α_i — рассчитанные числовые коэффициенты, зависящие от пространственно-временного распределения интенсивности лазерного излучения). Зафиксировав эти значения, численно решаем двухпараметрическую обратную задачу с использованием всей кривой насыщения флуоресценции. Определяемыми параметрами на

втором этапе являются: обобщенное время дезактивации возбужденного состояния τ и сечение возбуждения σ. Далее, используя найденное на первом этапе значение параметра *A*, вычисляем параметр γn_0.

Кривые насыщения измерялись с помощью флуориметра, в котором в качестве излучателя использовался наносекундный твердотельный Nd^{3+} YAG с удвоителем частоты. Длительность импульса на длине волны 532 нм составляла 25 нс. Энергия импульса на выходе излучателя изменялась в диапазоне 100 мкДж – 20 мДж перестраиваемым аттенюатором на основе электрооптической ячейки Поккельса. Результирующая плотность потока фотонов варьировалась в диапазоне от 10^{23} до $1.5 \cdot 10^{25}$ $см^{-2} \cdot с^{-1}$. Спектр флуоресценции при возбуждении лазерными импульсами регистрировался в диапазоне длин волн 600–700 нм оптическим многоканальным анализатором.

Результаты

Изменения в фотофизических параметрах хлорофилла-а и хлорофиллсодержащих комплексов фотосинтетического аппарата при избыточном освещении. С использованием НЛФ из кривых насыщения, измеренных в темноте и в условиях светового стресса, были определены фотофизические параметры Хл-*а* (σ, τ, и γn_0). Из табл. 1 видно падение квантового выхода флуоресценции хлорофилла при избыточном освещении, что, в первую очередь, было связано с активацией молекулярного механизма диссипации избыточной энергии (нефотохимического тушения). В данном случае этот механизм был связан с оранжевым каротиноидсодержащим белком (Orange carotenoid-binding protein, OCP) [13]. В то же время мы не наблюдали изменений в таких фотофизических параметрах, как время релаксации или эффективное сечение поглощения. Этот факт согласуется предыдущими исследованиями, которые показали, что OCP-зависимая диссипация избыточной энергии связана с тушением флуоресценции фикобилисом (вспомогательных светособирающих комплексов цианобактерий, которые состоят из различных фикобилинов), а не хлорофиллсодержащего комплекса цианобактерий [8, 12, 13]. Мы также наблюдали существенное снижение в скоростях синглет-синглетной аннигиляции. Это может свидетельствовать о том, что OCP при присоединении к фикобилисоме вызывает конформационные изменения в хлорофиллсодержащем светособирающем комплексе.

При тех же экспериментальных условиях были определены фотофизиологические параметры *Synechocystis sp.* с использованием FIRe флуорометрии (табл. 2). Из таблицы видно, что максимальный уровень флуоресценции снижается на 30 %, в то время как остальные параметры, характеризующие процесс поглощения и миграции энергии в хлорофиллсодержащем светособирающем комплексе цианобактерий, в пределах погрешностей, не изменяются. Последнее согласуется с данными, полученными с помощью метода нелинейной лазерной флуорометрии, подтверждая

Таблица 1

Фотофизические параметры молекулы хлорофилла а цианобактерии *Synechocystis sp.*, полученные методом нелинейной лазерной флуориметрии

	Φ_0, %	τ, нс	σ, $см^2$	γn_0, $с^{-1}$
Темновая адаптация	100 ± 4	0.35 ± 0.09	$(3.7 \pm 1.1) \cdot 10^{-16}$	$(9.5 \pm 3.3) \cdot 10^{10}$
Световой стресс	55 ± 2	0.39 ± 0.10	$(3.5 \pm 1.0) \cdot 10^{-16}$	$(1.4 \pm 0.5) \cdot 10^{10}$

Примечание: значение Φ_0, приведенное в таблице, нормировано на значение Φ_0, полученное для образцов после темновой адаптации.

Таблица 2

Фотофизиологические параметры хлорофиллсодержащего светособирающего комплекса дикого типа цианобактерий *Synechocystis sp.*, полученные при помощи метода индукции и релаксации флуоресценции

	F_m, %	$\sigma_{ФС2}$, $см^2$	*p*, отн. ед.
Темновая адаптация	100 ± 2	$(3.8 \pm 0.4) \cdot 10^{-16}$	0.33 ± 0.05
Световой стресс	70 ± 2	$(3.4 \pm 0.4) \cdot 10^{-16}$	0.40 ± 0.06

Примечание: значение F_m, приведенное в таблице, нормировано на значение F_m, полученное для образцов после темновой адаптации. Возбуждение флуоресценции на 440 нм.

отсутствие прямого переноса энергии с хлорофилла-*a* на молекулы тушителя. Представленные данные дополняют предыдущие исследования авторов по этой теме [8], где было показано, что тушение флуоресценции при избыточном освещении вызвано прямым тушением фикобилинсодержащего комплекса. Таким образом, основываясь на результатах двух независимых методов, можно сделать однозначный вывод об отсутствии переноса энергии между молекулами хлорофилла а и молекулами тушителя (OCP).

Изменения в фотофизиологических параметрах хлорофиллсодержащего светособирающего комплекса цианобактерий, выращенных при различных световых условиях. Для исследования влияния спектральных характеристик внешнего освещения на фотофизиологические параметры цианобактерий мы выращивали клетки Synechocystis sp. при различных световых условиях (использовался свет красных (50 и 200 мкЭ·м$^{-2}$·с$^{-1}$) или синих (50 и 200 мкЭ·м$^{-2}$·с$^{-1}$) светодиодов). Дополнительно к стандартным фотофизиологическим параметрам, определяемым при помощи метода индукции и релаксации флуоресценции, также определялся коэффициент нефотохимического тушения:

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m', \quad (4)$$

где F_m — максимальный уровень флуоресценции, определенный в темноте, а F_m' — максимальный уровень флуоресценции, определенный на свету. Мы обнаружили уменьшение значения параметра фотосинтетической активности (F_v /F_m) в образцах, выращенных на красном свету. Занижение значения этого параметра вызвано высокой «фоновой» флуоресценцией фикобилисом. В культурах, выращенных на синем свету (который поглощается в основном хлорофиллом а), содержание фикобилисом меньше, что было хорошо видно в низкотемпературных спектрах флуоресценции (данные не приведены), поэтому «фоновая» флуоресценция была меньше и значение фотосинтетической активности близко к истинному. Значения коэффициента нефотохимического тушения (определяемого по тушению флуоресценции при сверхвысоких значения интенсивности внешней засветки) также свидетельствуют о различиях в соотношении между фикобилин- и хлорофиллсодержащими комплексами в клетках, выращенных на синем или красном свету. Поскольку тушение происходит именно в фикобилисомах, то в клетках, которые содержат большее их количество (т. е. выращенные на красном свету), эффект тушения флуоресценции будет больше. В то же время клетки, выращенные на красном свету, имеют меньшие значения функционального сечения фотоситемы 2 ($\sigma_{ФС2}$), что может говорить о пониженном содержании фикоцианина (одного из пигментов фикобилисомы) как следствие фотоадаптации. Этот факт также подтверждается более низкими значениями параметра «связанности» в клетках, выращенных на красном свету, что означает меньшую степень взаимодействия между светособирающими комплексами за счет полного или частичного отсутствия молекул фикоцианина. Кроме того, из табл. 3 видно, что образцы, выращенные на слабом свету, обладают большей светособирающей антенной, что необходимо для сохранения высоких скоростей фотосинтеза в условиях пониженного освещения. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что спектральные характеристики внешнего освещения, а также его интенсивность существенным образом влияют на число и соотношения фикобилин- и хлорофиллсодержащих комплексов и на содержание пигментов

Таблица 3

Фотофизиологические параметры светособирающего комплекса дикого типа цианобактерий *Synechocystis sp.*, полученные при помощи метода индукции и релаксации флуоресценции, для образцов, выращенных при различном освещении

Фотофизиологический параметр / Режим освещения	F_v /F_m, отн.ед.	σ_{PSII}, см^2	*p*, отн. ед.	*NPQ*, абс. ед.
Сильный красный	0.16 ± 0.01	(9.1 ± 0.1) 10−16	0.28 ± 0.04	2.05 ± 0.05
Слабый красный	0.36 ± 0.02	(10.2 ± 0.2) 10−16	0.22 ± 0.03	1.65 ± 0.06
Сильный синий	0.52 ± 0.03	(11.2 ± 0.2) 10−16	0.38 ± 0.05	0.71 ± 0.04
Слабый синий	0.52 ± 0.03	(12.0 ± 0.2) 10−16	0.42 ± 0.06	0.94 ± 0.05

Примечание: Возбуждение флуоресценции на 590 нм.

в этих комплексах. Эти изменения проявляются в измеряемых фотофизиологических параметрах, что говорит о возможности оценки световых условий, при которых росли клетки цианобактерий *in situ* при помощи FIRe флуорометрии.

***

В работе продемонстрированы возможности метода индукции и релаксации флуоресценции и метода нелинейной лазерной флуорометрии, а также их совместного применения для исследования физиологического состояния цианобактерий. Было показано, что хлорофиллсодержащий светособирающий комплекс цианобактерий не взаимодействует с молекулами тушителя (OCP) при индукции нефотохимического тушения при избыточном освещении. Принимая во внимание предыдущие результаты, можно сделать вывод о том, что молекулы аллофикоцианина являются единственным местом взаимодействия OCP со светособирающим комплексом цианобактерий. Было также показано, что условия освещенности существенным образом влияют на пигментный состав и соотношение между фикобилин- и хлорофиллсодержащими комплексами, что проявляется в определяемых фотофизиологических параметрах и может использоваться для *in situ* диагностики цианобактерий.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-17-00451).

References

1. *Shaw B. P., Sahu S. K., Mishra R. K.* Heavy Metal Induced Oxidative Damage in Terrestrial Plants. In: Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Ed. by Prasad M. N. V. *Berlin, Springer,* 2004. 84–126.
2. *Hallare A. V., Lasofin K. J. A., Magallanes J. R.* Shift in Phytoplankton Community Structure in a Tropical Marine Reserve Before and After a Major oil Spill Event. *Journal of Environmental Research*. 2011, 5, 3, 651–660.
3. *Gorbunov M. Y., Falkowski P. G.* Fluorescence induction and relaxation (FIRe) technique and instrumentation for monitoring photosynthetic processes and primary production. In: Aquatic Ecosystems, Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives. Ed. by der Est, Van, Bruce, D. *Lawrence, Alliance Communications Group*, 2005. 1029–1031.
4. *Rohacek K., Bartak M.* Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters and some applications. *Photosynthetica*. 1990, 37, 339–363.
5. *Fadeev V. V., Dolenko T. A., Filippova E. M., Chubarov V. V.* Saturation spectroscopy as a method for determining the photophysical parameters of complicated organic compounds. *Opt. Commun*. 1999, 166, 25–33.
6. *Schatz G. H., Brock H., Holzwarth A. R.* Kinetic and Energetic Model for the Primary Processes in Photosystem II. *Biophysical journal.* 1988, 54, 3, 397–405.
7. *Fadeev V. V., Shirshin E. A.* Nonlinear laser flurescence spectroscopy of natural organic compounds. In: Handbook of Coherent-Domain Optical Metods: Biomedical Diagnostics, Enviromental Monitoring, and Material Science. Ed. by V. V. Tuchin. *New York, Springer Science+Business Media,* 2013. 1255–1288.
8. *Kuzminov F. I., Karapetyan N. V., Rakhimberdieva M. G., Elanskaya I. V., Gorbunov M. Y., Fadeev V. V.* Investigation of OCP-Triggered Dissipation of Excitation Energy in PSI/PSII-less Synechocystis sp. PCC 6803 Mutant Using Non-Linear Fluorimetry. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012, 1817, 1012–1021.
9. *Gostev T. S., Kuzminov F. I., Gorbunov M. Y., Voronova E. N., Fadeev V. V.* Effect of Variations in Salinity and Nitrogen Concentration on Photophysical Parameters of Phytoplankton Obtained with Fluorescence Spectroscopy. *EARSEL eProceedings.* 2012, 11, 2, 1–10.
10. *Gostev T. S., Fadeev V. V.* Determination of photophysical parameters of chlorophyll a in photosynthetic organisms using the method of nonlinear laser fluorimetry. *Quantum Electron.* 2011, 41, 414–419.
11. *Maslov D. V., Ostroumov E. E., Fadeev V. V.* Saturation fluorimetry of complex organic compounds with high local concentration of fluorophores (by the example of phytoplankton). *Quantum Electron.* 2006, 36, 163–168.
12. *Gorbunov M. Y., Kuzminov F. I., Fadeev V. V., Kim J. D., Falkowski P. G.* A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, 1807, 1591–1599.
13. *Kirilovsky D., Kerfeld C. A.* The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein. *Photochemical & Photobiological Sciences.* 2013, 12, 7, 1135–1143.

Статья поступила в редакцию 19.04.2014 г.