

Определение фотофизических параметров хлорофилла *a* в фотосинтезирующих организмах методом нелинейной лазерной флуориметрии

Т.С.Гостев, В.В.Фадеев

*Исследованы возможности решения многопараметрической обратной задачи нелинейной лазерной флуориметрии молекулярных систем с высокой локальной концентрацией флуорофоров (на примере молекул хлорофилла *a* в фотосинтезирующих организмах). Предложены алгоритмы, позволяющие определять из экспериментальных кривых насыщения флуоресценции до четырех фотофизических параметров хлорофилла *a*. Проведена численная проверка единственности и устойчивости решения обратной задачи по предложенным алгоритмам. Описан созданный в ходе выполнения работы лазерный спектрометр для нелинейной лазерной флуориметрии в квазистационарном и нестационарном режимах возбуждения. Предложенные в работе алгоритмы апробированы на чистых культурах микроводорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Chlamydomonas reinhardtii*, находящихся в различных функциональных состояниях.*

Ключевые слова: соединения с высокой локальной концентрацией флуорофоров, флуоресценция хлорофилла *a*, нелинейная флуориметрия, алгоритмы решения обратной задачи.

1. Введение

Флуоресценция молекул хлорофилла *a* (Хл *a*), основного пигмента фотосинтезирующих организмов (ФСО), широко используется для получения информации об их функциональном состоянии [1]. Для измерения фотофизических параметров фотосинтетического аппарата ФСО как целого применяются методы индукции флуоресценции [2], из которых наиболее современным является метод индукции и релаксации флуоресценции [3].

Возможности флуоресцентной диагностики ФСО значительно возрастают, если определение фотофизических параметров фотосинтетического аппарата как целого дополнено определением фотофизических параметров молекул Хл *a* (естественно, в нативном ФСО). В настоящее время такие измерения могут быть выполнены только методом нелинейной лазерной флуориметрии (флуориметрии насыщения) [4].

Первые исследования возможностей измерения этих характеристик методом нелинейной лазерной флуориметрии были проведены в [5]. В [6] успешно решена двухпараметрическая обратная задача нелинейной лазерной флуориметрии: с использованием малопараметрической модели, описывающей кривую насыщения флуоресценции водоросли, удалось измерить два фотофизических параметра – так называемые ненасыщенный флуоресцентный параметр Φ_0 (нормированное на линейный репер число фотонов флуоресценции в отсутствие насыщения) и параметр насыщения A , равный произведению трех фотофизических параметров Хл *a*: сечения возбуж-

дения, времени жизни возбужденного состояния и скорости синглет-синглетной аннигиляции.

В настоящей работе теоретически и экспериментально исследуются возможности увеличения размерности обратной задачи нелинейной лазерной флуориметрии ФСО (на примере фитопланктона) и, как следствие, возможность раздельного определения указанных выше фотофизических параметров.

2. Теория. Численное моделирование обратной задачи нелинейной лазерной флуориметрии ФСО

Нелинейная лазерная флуориметрия [7] основана на регистрации нелинейной зависимости числа фотонов флуоресценции N_{fl} от плотности потока фотонов возбуждающего лазерного излучения – кривой насыщения флуоресценции. Принципиальной особенностью ФСО как объекта флуориметрии является высокая локальная концентрация n_0 молекул флуорофора (Хл *a*) в пигмент-белковом комплексе фотосинтетической единицы ($n_0 = 10^{19} - 10^{21} \text{ см}^{-3}$). По этой причине насыщение флуоресценции при использовании для возбуждения наносекундных лазерных импульсов начинает проявляться уже при низкой для соответствующих лазеров плотности потока фотонов $F \approx 10^{21} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и связано, в первую очередь, с синглет-синглетной аннигиляцией [4] возбужденных состояний флуорофоров.

При дальнейшем увеличении интенсивности возбуждающего излучения все большую роль начинает играть динамическое обеднение их основного состояния. Эти два процесса в основных чертах и определяют форму кривой насыщения флуоресценции ФСО, а описывающие их параметры могут, в принципе, быть найдены из экспериментальной кривой насыщения в результате решения соответствующей обратной задачи с использованием принятой модели формирования флуоресцентного от-

Т.С.Гостев, В.В.Фадеев. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: onewhowaits@mail.ru

Поступила в редакцию 11 января 2011 г., после доработки – 10 марта 2011 г.

клика флуорофоров на импульсное лазерное возбуждение с заданными параметрами [4].

В общем случае число фотофизических параметров, описывающих два указанных процесса, достигает десяти, поскольку в фотосинтетическом аппарате имеется целый ряд каналов возбуждения и релаксации возбужденного состояния молекул Хл *a*. Для типичных кривых насыщения флуоресценции ФСО (рис. 1) обратная задача с таким большим числом определяемых параметров не может быть решена (является некорректной). Поэтому в [8] была предложена малопараметрическая модель, описывающая кривую насыщения флуоресценции ФСО как объекта с высокой локальной концентрацией флуорофоров. В модели фигурируют три обобщенных (в определенном смысле) фотофизических параметра: σ – сечение возбуждения молекул Хл *a*, учитывающее как прямое поглощение света этими молекулами, так и перенос на них энергии с молекул вспомогательных пигментов; τ – эффективное время жизни молекул Хл *a*, учитывающее все процессы дезактивации возбужденного состояния, кроме синглет-синглетной аннигиляции; γn_0 – максимальная скорость синглет-синглетной аннигиляции (γ – константа скорости).

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

$$\frac{dn(t, \mathbf{r})}{dt} = F(t, \mathbf{r})\sigma[n_0 - n(t, \mathbf{r})] - \frac{n(t, \mathbf{r})}{\tau} - \gamma n^2(t, \mathbf{r}), \quad (1)$$

где \mathbf{r} – радиус-вектор в поперечном сечении лазерного пучка; z – координата вдоль направления распространения лазерного импульса. Число фотонов флуоресценции из возбуждаемого объема среды дается выражением

$$N_{\text{fl}} = k_{\text{fl}} \iiint_V d^3r dz \int_{-\infty}^{\infty} n(\mathbf{r}, z, t; F) dt, \quad (2)$$

где k_{fl} – скорость излучательного распада возбужденного

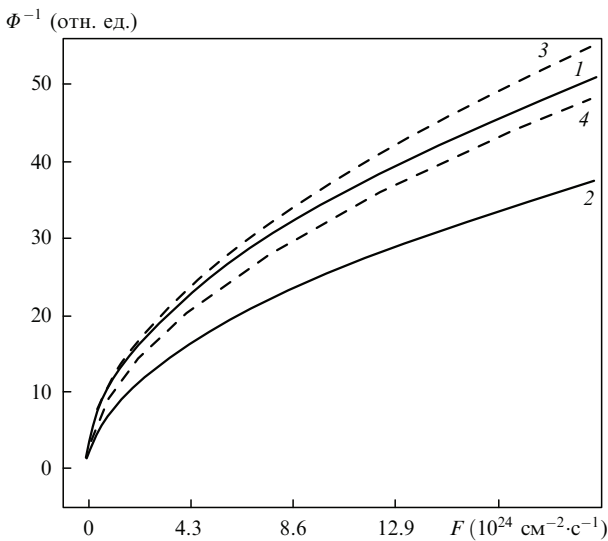


Рис. 1. Модельные кривые насыщения флуоресценции при фиксированном параметре насыщения ($A = 10^{22} \text{ см}^2 \cdot \text{с}$), $\sigma = 1 \times 10^{-16} \text{ см}^2$, $\tau = 1 \times 10^{-9} \text{ с}$, $\gamma n_0 = 1 \times 10^{12} \text{ с}^{-1}$ (1, 2), $\sigma = 8 \times 10^{-16} \text{ см}^2$, $\tau = 0.5 \times 10^{-9} \text{ с}$, $\gamma n_0 = 0.5 \times 10^{12} \text{ с}^{-1}$ (3, 4), длительности лазерных импульсов 25 нс (квазистационарный режим; 1, 3) и 0.3 нс (нестационарный режим; 2, 4).

состояния флуорофора; $n(\mathbf{r}, z, t; F) = n(\mathbf{r}, z, t; F(\mathbf{r}, t))$, σ , τ , γ , n_0 – решение уравнения (1); V – объем, из которого принимается сигнал флуоресценции. Отметим, что зависимостью плотности потока фотонов возбуждающего излучения F 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 F возбуждающего лазерного излучения. Для перехода к величинам, которые можно измерить в абсолютных единицах, необходимо провести нормировку числа регистрируемых квантов флуоресценции N_{fl} на некоторый реперный сигнал N_r , линейно зависящий от плотности потока фотонов возбуждающего излучения. Отношение $\Phi = N_{\text{fl}}/N_r$ будем, следуя [7], называть флуоресцентным параметром, а зависимость $\Phi^{-1}(F)$ – кривой насыщения флуоресценции. Флуоресцентный параметр в отсутствие насыщения Φ_0 связан с $\Phi(F)$ очевидной формулой:

$$\Phi_0 = \lim_{F \rightarrow 0} \Phi(F).$$

О размерности обратной задачи нелинейной флуориметрии (максимальном числе однозначно определяемых параметров) можно судить по степени полинома, аппроксимирующего с заданной точностью кривую насыщения флуоресценции. Для ФСО эта кривая, измеренная в диапазоне плотностей потока фотонов $10^{21} - 3 \times 10^{25} \text{ см}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, с высокой точностью описывается полиномом третьей степени, что указывает на возможность определения из нее до четырех параметров. В работе [6] использовался только начальный участок кривой насыщения ($F = 10^{20} - 10^{22} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), на котором доминирующим механизмом нелинейности является синглет-синглетная аннигиляция, а динамическое обеднение основного состояния еще не проявляется. В результате степень аппроксимирующего полинома снижается до единицы, а размерность обратной задачи – до двух; при этом определяются ненасыщенный флуоресцентный параметр Φ_0 и параметр насыщения $A = \sigma \tau^2 \gamma n_0$. Тогда кривую насыщения удастся описать приближенным аналитическим выражением

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

если реализуется квазистационарный режим возбуждения, когда длительность лазерного импульса на порядок больше характерного времени дезактивации возбужденных состояний молекул Хл *a* в клетках ФСО, которое не превышает 1 нс [9]. В (3) α_i – рассчитанные численные коэффициенты, зависящие от пространственно-временного распределения интенсивности лазерного излучения (коэффициенты α_1 и α_2 удовлетворяют условию $\alpha_1 + \sqrt{\alpha_2} = 1$, что следует из определения параметра Φ_0). На рис. 1 продемонстрирована эта особенность начального участка кривой насыщения в квазистационарном режиме возбуждения: кривые насыщения для разных значений σ и τ , но одинаковых значений A , совпадают с большой точностью. Отметим сразу, что в нестационарном режиме возбуждения ситуация иная, как это видно из рис. 1. Эти закономерности объясняются особенностями фотофизических процессов, формирующих кривые насыщения в разных режимах возбуждения, и используются в

данной работе при создании двухэтапного алгоритма решения обратной задачи (см. ниже).

В [10] продемонстрирована высокая чувствительность параметра насыщения A к видовой принадлежности водоросли (изменению состава вспомогательных пигментов) и состоянию фотосинтетического аппарата, однако выделить индивидуальный вклад каждого фотофизического параметра модели (1) в его изменение не представлялось возможным. Это ограничивало применимость метода для исследования фотофизических процессов в ФСО и диагностики состояния фотосинтетического аппарата.

В настоящей работе предложен двухэтапный алгоритм, позволяющий с достаточно высокой точностью отдельно определять все фотофизические параметры Хл a , фигурирующие в модели (1). Алгоритм реализуется в двух вариантах: с использованием только одной кривой насыщения флуоресценции, снятой в квазистационарном режиме возбуждения (вариант 1), и с использованием двух кривых насыщения, одна из которых получена в квазистационарном, а другая – в нестационарном режиме возбуждения (вариант 2).

В варианте 1 измеряется кривая насыщения флуоресценции с использованием лазерных импульсов длительностью свыше 10 нс (квазистационарный режим возбуждения), но в значительно более широком диапазоне изменения плотности потока фотонов ($F = 10^{21} - 3 \times 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), чем в [6]. В принципе это позволяет путем решения обратной задачи определить все четыре параметра – Φ_0 , σ , τ , γ_0 . Однако, как показало численное моделирование, устойчивость решения к шумам входных данных (кривой насыщения) невелика (уже при уровне шума входных данных $\sim 5\%$ среднеквадратичные ошибки определения параметров достигают 45%).

Для снижения ошибок предлагается двухэтапный алгоритм, основанный на априорной информации, которая следует из анализа фотофизических процессов в системах с высокой локальной концентрацией флуорофоров и состоит в том, что на начальном участке кривой насыщения (при $F = 10^{21} - 8 \times 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) динамическое обеднение основного состояния выражено слабо, поэтому им можно пренебречь и обрабатывать кривую насыщения с использованием квазистационарного приближения по формуле (3); при этом определяются значения параметров Φ_0 и A . Зафиксировав их, численно решаем двухпараметрическую обратную задачу с использованием всей кривой насыщения флуоресценции. Определяемыми параметрами на этом, втором этапе являются обобщенное время дезактивации возбужденного состояния τ и сечение возбуждения σ . Далее, используя найденное на первом этапе значение параметра A , вычисляем параметр γ_0 .

В табл.1 приведены результаты оценки единственности решения обратной задачи с использованием предло-

женного метода. Для этого при решении прямой задачи генерируются три кривые насыщения, различающиеся в каждой точке не более чем на 1%. Затем из незашумленных кривых в ходе решения обратной задачи определяются параметры модели и погрешность их восстановления. При решении обратной задачи применялся метод Левенберга – Марквардта [11].

Из табл.1 видно, что погрешность восстановления параметров значительно меньше их разности для двух любых кривых. Этот факт характеризует единственность решения обратной задачи. Для простоты ненасыщенный флуоресцентный параметр Φ_0 при генерации всех кривых принимался равным 1, погрешность восстановления его значения не превышала 1%.

Для оценки устойчивости решения обратной задачи к шумам входных данных модельные кривые зашумлялись по следующему закону:

$$\Phi_{\text{noise}}^{-1}(F) = \Phi^{-1}(F) \left[RA(F_{\min}) \sqrt{\frac{F_{\min}}{F}} \right], \quad (4)$$

где R – случайное число, лежащее в интервале $[-1, 1]$; $A(F_{\min})$ – амплитуда шума в минимуме кривой насыщения при $F = F_{\min}$.

Такая модель наиболее точно описывает шум использованной в наших экспериментах системы регистрации. Каждая зависимость зашумлялась независимо десять раз шумом с заданной амплитудой, после чего решалась обратная задача и определялись среднеквадратичные отклонения каждого восстановленного параметра от его значения при генерации модельных кривых на этапе решения прямой задачи. Результаты моделирования приведены в табл.2.

Как видно из представленных результатов, при шуме входных данных $\sim 5\%$, что достижимо в условиях реального эксперимента, погрешность определения фотофизических параметров не превышает 23%. Это приемлемо для ряда применений, особенно в тех случаях, когда используются не абсолютные значения параметров, а их изменение под действием тех или иных факторов.

Из рассмотрения механизма динамического обеднения основного состояния ясно, что этот эффект должен сильнее проявляться, когда для возбуждения флуорофоров используются лазерные импульсы длительностью, меньшей времени релаксации их возбужденных состояний (нестационарный случай). Это качественно иллюстрирует рис.1. Вариации значений сечения возбуждения σ и времени релаксации τ приводят в этом случае к большому различию кривых насыщения, чем в случае квазистационарного возбуждения, что свидетельствует о большей устойчивости решения обратной задачи к случайным погрешностям.

На этой физической априорной информации основан вариант 2 двухэтапного алгоритма, являющийся еще од-

Табл.1. Результаты численного моделирования обратной задачи нелинейной флуориметрии, полученные по варианту 1 двухэтапного алгоритма ($F = 10^{21} - 3 \times 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Модельная кривая	Значение A ($10^{-23} \text{ см}^2 \cdot \text{с}$)		Значение σ (10^{-16} см^2)		Значение τ (10^{-10} с)		Значение γ_0 (10^{11} с^{-1})	
	заданное	восстановленное	заданное	восстановленное	заданное	восстановленное	заданное	восстановленное
1	1.13	1.15	2.50	2.67	3.00	2.84	5.00	4.78
2	1.17	1.18	7.30	6.78	9.00	9.47	4.00	3.83
3	1.21	1.22	4.80	5.13	5.00	4.76	1.00	0.96

Примечание. Погрешности определения A , σ , τ и γ_0 составляют 1%, 7%, 5% и 4% соответственно.

Табл.2. Устойчивость решения обратной задачи по двухэтапному алгоритму к шумам входных данных.

Амплитуда входного шума (%)	Вариант решения обратной задачи	Погрешность определения σ (%)	Погрешность определения τ (%)	Погрешность определения γ_{H_0} (%)
1	1	9	6	5
	2	7	5	5
3	1	16	11	14
	2	14	9	13
5	1	21	16	23
	2	17	15	19
10	1	34	29	36
	2	31	29	34

ним шагом в направлении повышения точности определения значений фотофизических параметров. В нем первый этап совпадает с таковым в варианте 1, т. е. используется начальный участок кривой насыщения, полученной в квазистационарном режиме возбуждения, и определяются параметры Φ_0 и A , а на втором этапе используется кривая насыщения флуоресценции при нестационарном возбуждении, когда длительность импульса равна 0.3 нс, а плотность потока фотонов изменяется в тех же, что и в квазистационарном режиме, пределах ($F = 10^{21} - 3 \times 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). (Длительности импульсов возбуждения 25 и 0.3 нс, использованные при моделировании, соответствуют параметрам лазерного спектрометра, на котором выполнялись эксперименты, см. ниже.)

Численная оценка устойчивости решения обратной задачи к шумам входных данных в рамках такого подхода показала, что погрешность восстановления параметров в этом варианте меньше, чем в варианте 1, особенно для параметра σ . Исходя из физических соображений, можно ожидать, что преимущество варианта 2 будет еще большим при решении задачи, в которой отдельно рассматриваются процессы переноса энергии между вспомогательными пигментами и Хл *a* в светособирающей антенне и с антенны на реакционный центр (в нашей модели они учтены в обобщенных параметрах σ и τ). Ожидаемое и подтвержденное численным моделированием преимущество варианта 2 – устойчивость решения обратной задачи к изменению характеристик лазерного импульса, которые являются фиксированными параметрами модели, в частности вариация длительности лазерного импульса в пределах 20 % приводит к изменению погрешности определения фотофизических параметров при решении обратной задачи не более чем на 5 %.

3. Эксперимент

3.1. Экспериментальная установка

Для реализации описанных выше алгоритмов был разработан лазерный спектрометр на базе двухкаскадного твердотельного излучателя (НИИ «Полюс» им. М.Ф.Стельмаха) с активными элементами YAG : Nd³⁺, работающий в режиме генерации импульсов длительностью 25 или 0.3 нс. Выходное излучение на основной длине волны 1064 нм преобразовывалось во вторую гармонику (длина волны 532 нм), энергия импульса которой плавно изменялась от нуля до максимального значения 12 мДж с помощью ячейки Поккельса.

Для регистрации сигнала флуоресценции применялся фотоэлектронный умножитель Н5784-20 (Hamamatsu) с

повышенной чувствительностью в красной области спектра; спектральная селекция осуществлялась узкополосным фильтром с максимумом пропускания на длине волны 685 нм, что соответствует положению максимума полосы флуоресценции Хл *a*. При использованной в наших экспериментах концентрации водорослей вкладом полосы комбинационного рассеяния воды (максимум на длине волны 651 нм, его ширина на полувысоте 20 нм) в регистрируемый сигнал можно было пренебречь.

Сигнал флуоресценции нормировался на сигнал в реперном канале, пропорциональный интенсивности лазерного излучения. В качестве детектора реперного канала применялся pin-фотодиод со встроенным предусилителем S8746-01 (Hamamatsu). Аналогичный детектор использовался и в системе запуска АЦП.

Для оцифровки сигналов детекторов применялись два многофункциональных устройства USB-6211 (National Instruments) с 16-битными АЦП. С учетом шумов и нелинейности детекторов система регистрации обеспечивала эффективный динамический диапазон ~5000, что позволяло регистрировать кривую насыщения флуоресценции микроводорослей в диапазоне плотностей потока фотонов возбуждающего излучения $F = 6 \times 10^{21} - 3 \times 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

3.2. Образцы

Для экспериментальной апробации предложенных в работе алгоритмов решения обратной задачи были выполнены измерения фотофизических параметров молекул Хл *a* в двух тестовых объектах – чистых культурах микроводорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Chlamydomonas reinhardtii* в различных функциональных состояниях: в адаптированных к темноте микроводорослях, находящихся в активном состоянии (DA); в прошедших световую адаптацию микроводорослях, находящихся в условиях светового стресса (LA); в прошедших обработку гербицидом диуроном (DCMU) в молярной концентрации 10⁻⁶ М микроводорослях с блокированной цепью транспорта электронов в реакционных центрах. Выбранные функциональные состояния являются характерными для ФСО и подробно исследуются в биофизике фотосинтеза [12].

Для предотвращения оседания клеток микроводорослей на дно кюветы во время эксперимента исследуемый объем среды постоянно перемешивался магнитной мешалкой. Для проверки отсутствия фотоингибирования ФСО под действием лазерных импульсов с использованными в эксперименте плотностями потока фотонов последовательно регистрировались две тестовые кривые

насыщения для одного образца с выключенным перемешиванием в кювете. При этом полученные кривые совпадали с точностью до экспериментальной погрешности.

3.3. Экспериментальные результаты и их обсуждение

На рис.2 приведены спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции одного из выбранных объектов – микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa*, находящейся в различных функциональных состояниях. Спектры получены на ламповом спектрофлуориметре Fluoromax-4 (HORIBA Jobin Yvon). Видно, что световая адаптация приводит к значительному снижению выхода флуоресценции, что связано с развитием в фотосинтетическом аппарате процессов нефотохимического тушения [13] возбужденных состояний молекул Хл *a* – одного из механизмов фотоадаптации ФСО. Форма полосы возбуждения флуоресценции при этом несколько меняется, что говорит о незначительном изменении композиционного состава пигментов. Обработка ингибитором электронного транспорта диуроном практически не сказывается на форме полосы возбуждения, но приводит к значительному увеличению выхода флуоресценции. Это имеет общепринятую биофизическую трактовку: диурон блокирует канал

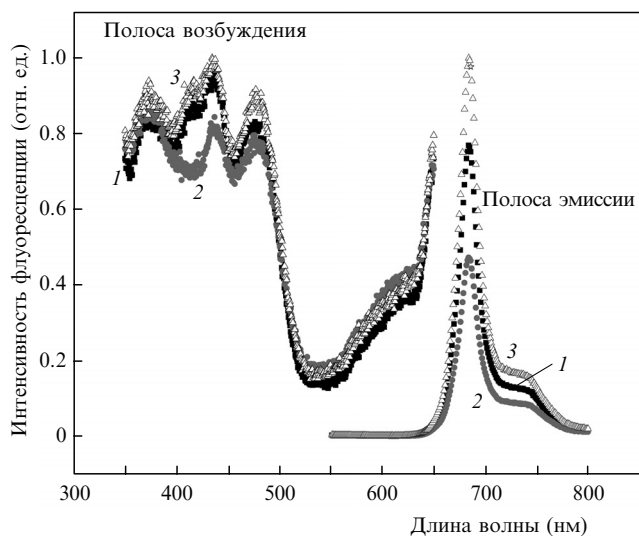


Рис.2. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa*, находящейся в функциональных состояниях DA (1), LA (2) и DCMU (3).

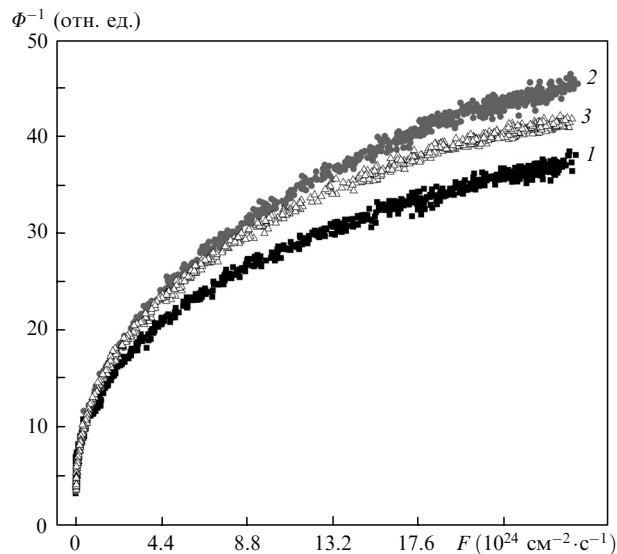


Рис.3. Кривые насыщения флуоресценции микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa*, находящейся в функциональных состояниях DA (1), LA (2) и DCMU (3), полученные в квазистационарном режиме возбуждения (длительность лазерных импульсов 25 нс при $F = 6 \times 10^{21} - 3 \times 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

переноса энергии возбуждения с молекул Хл *a* на реакционный центр.

Кривые насыщения для каждого из указанных объектов снимались по три раза (их примеры приведены на рис.3). Средние значения фотофизических параметров, определенных из экспериментальных кривых, даны в табл.3. Из нее видна ожидаемая зависимость сечения возбуждения σ от видовой принадлежности водоросли, причем различия в значениях σ согласуются с различиями в спектрах возбуждения флуоресценции. Более интересно проследить влияние факторов среды на фотофизические параметры.

Облучение микроводорослей постоянным интенсивным светом (световая адаптация) приводит к существенному изменению параметра τ – обобщенного времени жизни возбужденного состояния молекул Хл *a*, одной из причин которого является известный факт уменьшения скорости переноса энергии на реакционные центры как следствие перехода их в закрытое состояние [14]. Кроме того, как видно из табл.3, световая адаптация вызывает увеличение скорости синглет-синглетной аннигиляции,

Табл.3. Молекулярные фотофизические параметры Хл *a* в микроводорослях *Chlorella pyrenoidosa* и *Chlamydomonas reinhardtii*, находящихся в различных функциональных состояниях (DA – адаптированные к темноте, LA – адаптированные к свету, DCMU – обработанные диуроном).

Микроводоросль	Вариант решения обратной задачи	Φ_0 (отн. ед.)	A ($10^{-24} \text{ см}^2 \cdot \text{с}$)	σ (10^{-16} см^2)	τ (10^{-10} с)	γ_{n0} (10^{11} с^{-1})
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (DA)	1	0.2	5.7	5.6	5.8	3.2
	2					
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (DA)	1	0.3	2.4	3.3	4.5	3.9
	2					
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (LA)	1	0.4	23.2	6.1	11.2	3.7
	2					
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (LA)	1	0.4	5.5	3.5	7.2	2.7
	2					
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (DCMU)	1	0.4	16.7	6.9	12.4	1.9
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (DCMU)	1	0.5	7.6	3.9	9.9	2.1

что может быть связано с конформационными изменениями в фотосинтетическом аппарате, которые ранее не отмечались. Сечение возбуждения при этом меняется незначительно, что хорошо согласуется с отсутствием заметных изменений в спектре возбуждения флуоресценции (рис.2) и говорит о сохранении композиционного состава вспомогательных пигментов фотосинтетического аппарата.

Добавление диурона, как отмечалось, блокирует перенос энергии на реакционный центр, что приводит к увеличению времени жизни возбужденного состояния молекул Хл *a*. При этом изменяется еще один параметр – скорость синглет-синглетной аннигиляции. Это может быть связано с изменениями в пигмент-белковой матрице светособирающего комплекса фотосинтетического аппарата, на что ранее не обращали внимания.

4. Заключение

В настоящей работе предложен и реализован двухэтапный алгоритм решения четырехпараметрической обратной задачи нелинейной лазерной флуориметрии фотосинтезирующих организмов (на примере микроводорослей) как представителей молекулярных систем с высокой локальной концентрацией хромофоров и флуорофоров, обуславливающей высокую скорость межмолекулярного переноса энергии возбуждения. Численным моделированием и экспериментально показана возможность определения флуоресцентного параметра Φ_0 , сечения возбуждения σ и обобщенного времени жизни τ молекул Хл *a*, а также максимальной скорости синглет-синглетной аннигиляции их возбужденных состояний γ/n_0 .

Установлены различия этих параметров для разных видов водорослей и влияние на них факторов среды, изменяющих физиологическое состояние клеток водорослей. Выполненный анализ результатов (даже весьма поверхностный с точки зрения биофизики фотосинтеза) свидетельствует о том, что определение фотофизических параметров молекул Хл *a* в нативных ФСО открывает

новые возможности в изучении механизмов фотофизических процессов в фотосинтетическом аппарате и в диагностике влияния на них факторов среды.

Результаты апробации метода нелинейной лазерной флуориметрии хорошо согласуются с литературными данными, полученными другими методами, в частности методом индукции и релаксации флуоресценции, и в то же время дополняют их.

Полученные результаты демонстрируют (на природном объекте) уникальные возможности нелинейной лазерной флуориметрии, позволяющей одновременно определять несколько фотофизических характеристик флуорофоров в сложных органических соединениях в рамках единого алгоритма и на одном приборе.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 08-05-00892 и 09-92515-ИК).

1. Shreiber U., Bilger W., Neubauer C., in *Ecophysiology of Photosynthesis* (Berlin: Springer-Verlag, 1994, p. 49).
2. Shreiber U., Neubauer C., Schliwa U. *Photosynth. Res.*, **65**, 36 (1993).
3. Gorbunov M., Falkowski P. *Proc. XIII Int. Congr. on Photosynthesis* (Montreal: Allen Press, 2004, p. 1029).
4. Фадеев В.В., Бунин Д.К., Венедиктов П.С. *Квантовая электроника*, **23**, 963 (1996).
5. Иванов И.Г., Фадеев В.В. *Квантовая электроника*, **15**, 191 (1988).
6. Маслов Д.В., Остроумов Е.Е., Фадеев В.В. *Квантовая электроника*, **36**, 163 (2006).
7. Фадеев В.В. *Вестник Моск. ун-та. Сер. Физика, астрономия*, **4**, 49 (1998).
8. Маслов Д.В., Фадеев В.В., Литвинов П.Н. *Вестник Моск. ун-та. Сер. Физика, астрономия*, **1**, 34 (2002).
9. Paschenko V.Z., Kononenko A.A., Protasov S.P., Rubín A.B., Rubín L.B., Uspenskaya N.Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 403 (1977).
10. Маслов Д.В., Ильяш Л.В., Остроумов Е.Е., Погосян С.И., Фадеев В.В. *Биофизика*, **50**, 843 (2005).
11. Nocedal J., Wright S. *Numerical Optimization* (Berlin: Springer-Verlag, 2006).
12. Grouneva I., Jakob T., Wilhelm C., Goss R. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 929 (2009).
13. Vredenberg W., Durchan M., Prasil O. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1468 (2009).
14. Mozzo M., Passarini F., Bassi R., Van Amerongen H., Croce R. *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1263 (2008).