

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.344

Оценка гетерогенности комплексов фотосистемы II клеток водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях азотного голодания с использованием математической модели

Р.Н. Червицов* , С.С. Хрущев , П.В. Фурсова , Т.Ю. Плюснина

Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24

*e-mail: roman123qwe123@gmail.com

Изучение реакций клеток микроводорослей на такие стрессовые воздействия, как недостаток элементов минерального питания, является важной экологической задачей. Изменения, происходящие в фотосинтетическом аппарате, отражаются на кинетике экспериментально измеренных кривых индукции флуоресценции хлорофилла. Для анализа изменения формы кривых разрабатываются различные математические методы, позволяющие провести экспресс-анализ большого количества кривых. В работе продемонстрировано применение простой математической модели фотосистемы II (ФСII) для оценки изменения параметров ФСII культуры клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*, растущей при дефиците соединений азота в среде. Модель описывает переходы между тремя ключевыми состояниями ФСII, различающимися по степени окисления ее компонентов. С помощью этой математической модели было выявлено увеличение доли реакционных центров, содержащих антенны с меньшим размером, а также возрастание доли неактивных кислород-выделяющих комплексов.

Ключевые слова: математическая модель, гетерогенность фотосистемы II, фотосинтез, флуоресценция хлорофилла, азотное голодание, антенный комплекс, кислород-выделяющий комплекс

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-6

Введение

Оценка состояния водных экосистем, обеспечивающих жизнедеятельность фотосинтезирующих организмов, представляет собой важную экологическую задачу. Действие различных факторов стресса вызывает нарушение процессов, связанных с фотосинтезом, что в итоге может приводить к нарушению баланса водных экосистем и массовой гибели водорослей. К факторам, приводящим к нарушению процессов фотосинтеза и повреждению клеток, относится присутствие в среде обитания токсикантов, недостаточное или избыточное освещение, дефицит элементов минерального питания, таких как азот, фосфор или сера. В связи с этим актуальным является исследование изменения состояния фотосинтетического аппарата клеток водорослей при воздействии упомянутых факторов. Для исследования механизмов воздействия факторов стресса на фитопланктон удобно использовать лабораторную культуру водорослей *Chlorella vulgaris* [1, 2].

Одним из важнейших элементов минерального питания является азот. Азот входит в состав

всех аминокислот, из которых состоят белки, а также присутствует в молекулах хлорофилла. Дефицит азота приводит к снижению содержания хлорофилла и важнейших для растительных клеток белков тилакоидной мембраны, входящих в комплексы электрон-транспортной цепи хлоропластов — фотосистем I и II, цитохромного *b₆f*-комплекса и АТФ-синтазы, а также основного фермента, участвующего в фиксации CO₂ в темновой фазе фотосинтеза — рибулозодифосфаткарбоксилазы (рубиско) [3]. В итоге это приводит к снижению эффективности процессов световой фазы, к генерации активных форм кислорода за счет избыточной световой энергии и подавлению цикла Кальвина [4].

Фотосистема II (ФСII), схематическое изображение которой приведено на рис. 1А, является трансмембранным белковым комплексом, входящим в состав электрон-транспортной цепи хлоропласта. При поглощении кванта света димером хлорофилла P₆₈₀ происходит разделение зарядов: электрон от P₆₈₀ переходит последовательно на феофитин (Phe), первичный хинон Q_A и подвиж-

ный вторичный хинон Q_B ; окисленный димер хлорофилла P_{680}^+ восстанавливается за счет электронов, полученных при окислении воды марганцевым кластером $(Mn)_4$, входящим в состав кислород-выделяющего комплекса (КВК), и переходящих от $(Mn)_4$ на P_{680} через промежуточный акцептор тирозин- Z (Tyr_Z).

Реакционные центры ФСII гетерогенны по своей природе. Гетерогенность может проявляться в строении и размере светособирающей антенны [5], активности КВК [6] или в способности передавать электрон от ФСII к последующим переносчикам электрон-транспортной цепи [7]. По изменению характеристик, связанных с гетерогенностью реакционных центров, можно судить о воздействии факторов стресса.

В популяции реакционных центров ФСII выделяют альфа-центры с наибольшим размером антенны (в которых присутствуют и внутренняя, и периферическая антенны), а также бета-центры, у которых периферическая антенна отсутствует. Известно, что альфа- и бета-центры распределены в мембранах хлоропласта неравномерно: основной пул альфа-центров расположен в гранальных тилакоидах, а бета-центры — в основном в мембранах стромальной области [8]. Впервые гетерогенность реакционных центров обнаружена с помощью кривых индукции флуоресценции хлорофилла, измеренных в присутствии диурона (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, DCMU) [9]. DCMU — ингибитор переноса электронов с Q_A на Q_B ; поэтому такие кривые отражают только этап накопления восстановленного Q_A . В кинетике нарастания этих кривых визуально наблюдается только одна фаза (рис. 1Б), однако применение специальных методов анализа позволяет выявить несколько фаз, различающихся по

характерному времени восстановления Q_A , что объясняется наличием нескольких типов реакционных центров с различным размером антенного комплекса [9–12]. Наличие нескольких фаз можно выявить методом мультиэкспоненциальной аппроксимации либо с помощью математической модели [11]. Быстрая фаза кривой характеризует максимальный размер антенного комплекса (альфа-центры), который содержат наибольшее число белков антенны (периферической и внутренней). Медленная фаза кривой характеризует центры, в которых отсутствует часть периферического светособирающего комплекса (бета-центры).

Существует большое количество математических моделей, описывающих процессы, происходящие в ФСII, как детальных [13–15], так и упрощенных [11, 16, 17]. Модели ФСII обычно описывают кинетику индукции флуоресценции хлорофилла [11, 13–16] или затухания флуоресценции хлорофилла [17–19]. Такие модели используются для выявления связи между процессами, происходящими в фотосинтетическом аппарате, и формой кривой. Детальные математические модели, описывающие процессы в ФСII, хорошо подходят для решения прямых задач (изучение изменений формы кривой при изменении параметров), однако решение обратных задач — определение значений параметров модели по экспериментальным данным — как правило, неоднозначно, так как сходные изменения формы кривой могут быть связаны с изменением различных параметров. Упрощенные модели, содержащие небольшое число уравнений и параметров, напротив, часто позволяют решать обратные задачи, однако найденные параметры можно интерпретировать только в рамках тех упрощений, на основе которых строилась модель.

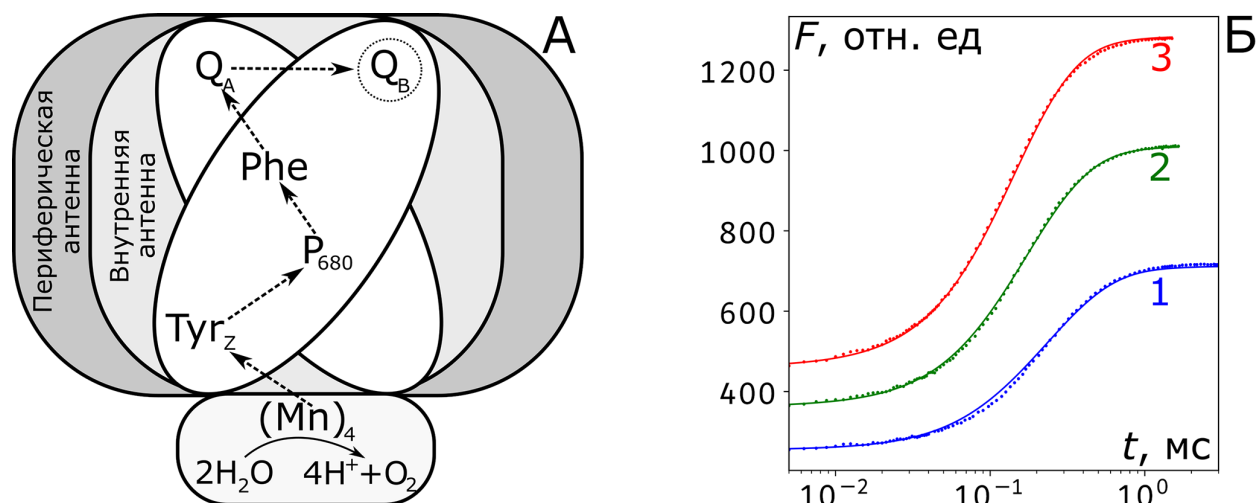


Рис. 1. (А) Схематическое изображение комплекса фотосистемы II. Элементы ФСII: $(Mn)_4$ — кислород-выделяющий комплекс (марганцевый кластер); Tyr_Z — тирозин- Z ; P_{680} — димер хлорофилла a ; Phe — феофитин; Q_A — первичный хинон, Q_B — вторичный хинон. Сплошной стрелкой показана реакция окисления воды, пунктирными стрелками — транспорт электрона. **(Б)** Типичные кривые индукции флуоресценции хлорофилла, измеренные в присутствии DCMU при действующем свете интенсивностью 3440 (кривая 1), 4900 (кривая 2), 6230 (кривая 3) $мкЭ \cdot м^{-2} \cdot с^{-1}$. Точки — экспериментальные данные, измеренные на 29-м ч роста культуры. Непрерывные кривые — результат аппроксимации экспериментальных данных с помощью модели.

Ранее [11] нами была разработана редуцированная математическая модель ФСЦ при действии DCMU, полученная из детальной модели путем ее пошаговой редукции. Простая форма полученных уравнений позволяет составлять комбинации из таких моделей для описания различных типов реакционных центров ФСЦ, что дает возможность выявлять их гетерогенность по размеру и строению антенного комплекса (альфа- и бета-центры), а также по активности КВК, которая не учитывалась в более ранних моделях [14, 17]. Основным ограничением модели является возможность учесть состояния элементов ФСЦ только до первичного хинона Q_A , поскольку для выявления гетерогенности реакционных центров ФСЦ необходимо исключить влияние процессов переноса электронов на последующие акцепторы электрон-транспортной цепи хлоропласта. Тем не менее редуцированная модель показала свою эффективность для описания гетерогенности ФСЦ у разных видов водорослей, которые культивировались при разной освещенности и температуре, избытке и недостатке элементов минерального питания в среде [11, 12]. В данной работе разработанная нами редуцированная модель ФСЦ [11] используется для оценки изменения соотношения долей реакционных центров ФСЦ с различным размером антенны и различной активностью КВК в ответ на стресс, вызванный дефицитом азота в среде при культивировании водорослей *Chlorella vulgaris*.

Материалы и методы

1. Получение экспериментальных данных

1.1. Культивирование микроводорослей. Эксперименты проводились на периодической культуре быстрорастущего термофильного штамма *Chlorella vulgaris*. Микроводоросли культивировали в панельном фотобиореакторе объемом 1 л на среде Тамия в разведении 1:30 при температуре $36,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, непрерывном освещении белым светом $180 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и продувке воздушной смесью с высоким содержанием CO_2 (0,4%) со скоростью потока 1 л в минуту. Перемешивание осуществлялось за счёт барботирования воздушной смесью. Подробное описание условий культивирования приведено в предыдущей работе [20]. Начальная оптическая плотность культуры при длине волны 675 нм составляла 0,01 в кювете толщиной 1 см. В ходе роста водорослей постепенно возникал дефицит азота в среде в связи с его поглощением растущей культурой.

1.2. Обработка проб DCMU и измерение индукционных кривых. Отборы проб для измерения кривых индукции флуоресценции проводились раз в 2 ч в период с 29-го ч по 47-й ч с момента начала культивирования. К 29-му ч роста культуры содержание NO_3^- снижалось с $52,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ до $3,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, к 31-му — до $1,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, к 33-му — до $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$

и в дальнейшем оставалось практически постоянным на уровне $0,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ [20]. Оптическая плотность культуры при длине волны 675 нм составляла 0,49 на 29-м ч культивирования и возрастала до 0,68 на 40-м ч культивирования, после чего снижалась до 0,6 на 47-м ч [20]. Перед измерением пробы инкубировали в течение 15 мин с DCMU в концентрации $6\cdot 10^{-6} \text{ М}$ в темноте. Кривые индукции флуоресценции продолжительностью 1500 мс измеряли при помощи флуориметра МЕГА-25 (создан на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ, Россия) [21] при трех интенсивностях действующего света — 3440, 4900 и $6230 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$. В качестве источника действующего света использовали светодиод с максимумом испускания на 455 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 670–750 нм с помощью кремниевого фотодиода.

2. Математическая модель

2.1. Схема и параметры модели ФСЦ. Для определения состояния и гетерогенности реакционных центров ФСЦ использовалась редуцированная математическая модель ФСЦ, описывающая кривую индукции флуоресценции хлорофилла при добавлении DCMU [11]. Схема редуцированной модели представлена на рис.2.

Система дифференциальных уравнений, описывающих схему на рис. 2, имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -k_x \cdot x \\ \frac{dy}{dt} = k_x \cdot x - k_y \cdot y \\ \frac{dz}{dt} = k_y \cdot y \end{cases}$$

где переменные x , y и z определяют долю реакционных центров; x — начальное состояние ФСЦ; y — состояние после поглощения фотона и разделения зарядов; z — состояние после восстановления P_{680} и окисления КВК; k_x и k_y — параметры, состоящие из сочетаний констант элементарных стадий детальной модели (для альфа- и бета-центров значения k_x различаются и в модели обозначаются $k_{x\alpha}$ и $k_{x\beta}$ соответственно) [11].

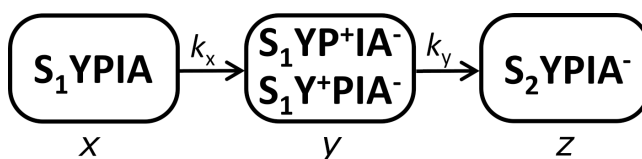


Рис. 2. Схема редуцированной модели. Элементы ФСЦ: S_1 и S_2 — состояния кислород-выделяющего комплекса; Y и Y^+ — состояния тирозина- Z , P и P^+ — состояния P_{680} (димера хлорофилла a); I — феофитин; A и A^- — состояния Q_A (первичного хинона). x , y , z — переменные модели, соответствующие ключевым состояниям ФСЦ.

Простой вид системы позволяет получить аналитическое решение:

$$\begin{cases} x = \exp(-k_x \cdot t) \\ y = \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_x \cdot t) - \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_y \cdot t) \\ z = \frac{k_y}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_x \cdot t) + \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_y \cdot t) + 1 \end{cases}$$

Интенсивность флуоресценции описывается как сумма интенсивностей флуоресценции от трех ключевых состояний ФСII и, с учетом нормировки на её максимальное значение F_M , для реакционных центров с активным КВК рассчитывается по формуле:

$$F^{s+} = F_{ot} \cdot x + \frac{K_{Pred}}{K_{Pred} + 1} \cdot y + z,$$

где F_{ot} — отношение минимальной флуоресценции к максимальной (F_0/F_M), K_{Pred} — константа равновесия перехода электрона с тирозина-Z на P_{680} (состояние y является квазиравновесным). Поскольку появление состояния z связано с переносом электрона от КВК, то для реакционных центров с неактивным КВК оно не рассматривается, и флуоресценция с учетом нормировки на F_M от таких реакционных центров рассчитывается по формуле:

$$F^{s-} = F_{ot} \cdot x + \frac{K_{Pred}}{K_{Pred} + 1} \cdot y,$$

Модель позволяет описать 4 типа реакционных центров ФСII, различающихся по активности КВК (активных и неактивных) и по составу антенных комплексов (альфа-центры содержат периферическую и внутреннюю антенну, бета-центры содержат только внутреннюю антенну). Общая флуоресценция образца в модели представлена как комбинация флуоресценций 4 типов реакционных центров:

$$F = \alpha \cdot (s \cdot F_{\alpha}^{s+} + (1-s) \cdot F_{\alpha}^{s-}) + \beta \cdot (s \cdot F_{\beta}^{s+} + (1-s) \cdot F_{\beta}^{s-}),$$

где s — доля активных КВК, α — доля альфа-центров, β — доля бета-центров ($\beta = 1 - \alpha$).

2.2. Определение значений параметров и их стандартных отклонений. Значения параметров модели определялись путем аппроксимации экспериментальных данных модельными кривыми при помощи программы DBSolve Optimum 2020 [22], а затем чувствительность параметров модели (стандартные отклонения) определялась при помощи модуля lmfit языка программирования Python [23]; в обеих программах сумма квадратов отклонений модельных значений от экспериментальных (χ -квадрат) использовалась в качестве критерия качества аппроксимации.

Результаты

Кривые индукции флуоресценции были измерены при трех разных интенсивностях действующего света: 3440, 4900 и 6230 мкЭ·м⁻²·с⁻¹. Использование различных интенсивностей измерительного света позволило корректно идентифицировать параметры модели, поскольку серия таких кривых описывается одним набором параметров за исключением констант (k_{xa} , k_{xb}), которые меняются пропорционально интенсивности измерительного света. При идентификации параметров модели по сериям кривых, относящихся к разным стадиям роста культуры, предполагалось, что могут меняться доля альфа-центров (α) и эффективный размер светособирающей антенны альфа-центров (k_{xa}), доли активных КВК (s), а также отношение минимального F_0 и максимального F_M значений кривых, $F_{ot} = F_0/F_M$, характеризующее квантовый выход процессов диссипации энергии в реакционном центре ФСII. Эффективный размер светособирающей антенны бета-центров (k_{xb}) предполагался одинаковыми на всех стадиях роста, поскольку он характеризует светосбор реакционных центров ФСII без присоединенных дополнительных светособирающих комплексов. При анализе активности КВК мы исходили из предположения «всё или ничего», то есть предполагалось, что изменение активности КВК связано только с изменением доли реакционных центров ФСII с активным КВК (s), в то время как константа перехода КВК из S_1 в S_2 (k_y) и константа равновесия переноса электрона с тирозина-Z на P_{680} (K_{Pred}) в реакционных центрах с активным КВК не изменяются. Аппроксимация модели проводилась по всему набору экспериментальных данных, значение коэффициента детерминации составляло $R^2 = 0,999876$. На рис. 1Б показаны экспериментальные данные и модельные кривые для 29-го ч роста культуры.

В ходе определения стандартных отклонений параметров была обнаружена тесная взаимосвязь параметра K_{Pred} с параметрами s и k_y , которая выражается в том, что для любого значения параметра K_{Pred} из достаточно широкого диапазона можно подобрать соответствующие значения параметров s и k_y , при этом качество аппроксимации модели практически не изменится — и, соответственно, стандартные отклонения для этих трех параметров оказываются очень большими. Тем не менее, наилучшая аппроксимация достигается при значении $K_{Pred} = 1,08$, при этом оценка доли реакционных центров ФСII с активным КВК (s) лежит внутри диапазона допустимых значений от 0 до 1, ни на одном из этапов культивирования не достигая предельных значений. В связи с этим при определении стандартного отклонения параметра K_{Pred} был рассмотрен как постоянная величина. Значения параметров, полученные для экспериментальных кривых, измеренных на разных стадиях роста культуры, представлены в таблице.

Таблица

Параметры, полученные в результате аппроксимации экспериментальных кривых при помощи модели индукции флуоресценции, измеренных на разных часах роста культуры водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота

	29 ч	31 ч	33 ч	35 ч	37 ч	39 ч	41 ч	43 ч	45 ч	47 ч
F_{ot}	0,36**	0,36**	0,38**	0,38**	0,38**	0,38**	0,40**	0,42**	0,43**	0,45**
K_{Pred}	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*
α	0,81 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,01
k_y	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73	28,45 ± 0,73
k_{xa}	4,49 ± 0,06	4,53 ± 0,06	4,69 ± 0,06	5,00 ± 0,06	5,28 ± 0,06	5,16 ± 0,06	5,57 ± 0,07	5,88 ± 0,08	6,14 ± 0,08	6,30 ± 0,09
k_{xb}	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06
s	0,84 ± 0,04	0,78 ± 0,04	0,57 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,13 ± 0,01

Примечания: Значения k_y , k_{xa} , k_{xb} приведены для интенсивности действующего света 3400 мкЭ·м⁻²·с⁻¹;

* – стандартное отклонение не определялось;

** – значение стандартного отклонения $\sigma < 0,01$.

Видно, что F_{ot} с момента исчерпания азота в среде (29-й ч роста культуры) увеличивается в течение 18 ч от 0,36 до 0,45 (на 25% по сравнению с начальным значением); соответственно квантовый выход первичных реакций фотосинтеза, выражающийся как $1 - F_{ot}$, падает на 14%. Таким образом, отсутствие азота в среде приводит к снижению эффективности работы ФСII. Доля альфа-центров (α), содержащих наибольшую по размеру антенну, включающую и периферическую, и внутреннюю части, спустя 18 ч после истощения азота в среде падает от 0,81 до 0,61 (на 25% от начального состояния), соответственно доля бета-центров (β), содержащих только внутреннюю антенну, увеличивается вдвое. Наибольшую чувствительность к отсутствию азота в среде показал КВК: доля активных КВК (s) за 18 ч уменьшилась от 0,84 до 0,13 (на 85% по сравнению с начальным значением), то есть за это время инактивировалась большая их часть.

Обсуждение

При анализе кривых индукции флуоресценции хлорофилла для культуры водорослей *Chlorella vulgaris* было выявлено снижение эффективности работы ФСII, выражающееся в возрастании F_{ot} (квантовый выход первичных фотохимических реакций, $F_v/F_M = 1 - F_{ot}$, при этом снижается). Снижение квантового выхода первичной фотохимии согласуется с полученными ранее оценками [20], которые были проведены с использованием JIP-теста. Вероятно, это связано с нарушением синтеза белков и хлорофилла при недостаточном количестве соединений азота. Одними из важных механизмов, защищающих фотосинтетический аппарат от различных повреждений и связанных с ними негативных эффектов, являются синтез и замена поврежденных белков, прежде всего, белка D1 – одной из кóровых субъединиц ФСII, которая наиболее подвержена светоиндуцированным повреждениям. Недостаток соединений азота в клетке существенно затрудняет использование этого за-

щитного механизма. Снижение доли альфа-центров, содержащих и периферическую, и внутреннюю антенну, может быть вызвано ингибированием синтеза белков периферического антенного комплекса и хлорофилла в связи с недостатком азота. Другая возможная причина – отсоединение периферического антенного комплекса от ФСII и его миграция к фотосистеме I (state transition): что приводит к перераспределению энергии между фотосистемами и защищает ФСII от избыточного поглощения энергии и повреждения фотосинтетического аппарата. При исчерпании азота в среде наблюдается увеличение световой константы альфа-центров – параметра, характеризующего эффективное сечение поглощения света. Это явление, по-видимому, обусловлено нарушением синтеза белков и пигментов, что затрудняет репарацию поврежденных реакционных центров. Поскольку альфа-центры организованы как димеры, при инактивации одного из центров энергия светособирающей антенны полностью направляется на оставшийся активный центр. В результате эффективное сечение поглощения на один активный реакционный центр возрастает.

Результаты, полученные с помощью редуцированной математической модели, в целом согласуются с оценками, проведенными нами ранее [20] для аналогичного эксперимента инкубирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота с помощью широко применяемого JIP-теста (метода, основанного на интерпретации значений флуоресценции в выбранных точках индукционной кривой и комбинации таких значений). Однако JIP-тест дает некие усредненные характеристики изменений для всех реакционных центров ФСII, тогда как математическая модель позволила выявить группы реакционных центров, различающихся по размеру светособирающей антенны и активности КВК, и описать изменение выявленной гетерогенности реакционных центров ФСII в процессе роста культуры в среде с дефицитом азота.

Заключение

Проведен анализ состояния и гетерогенности фотосинтетического аппарата клеток водорослей *Chlorella vulgaris*, выращенных в условиях дефицита соединений азота в среде, с помощью математической модели. В этих условиях снижалась эффективность работы ФСII, снижалось количество активных КВК, а также возрастало число реакционных центров без периферического антенного комплекса. Модель показала себя эффективным инструментом, обладающим высокой чувствительностью и информативностью при анализе изменений состояний ФСII в ответ на действие такого стресса, как азотное голодание. Предложенный

подход может применяться как в фундаментальных исследованиях, так и при решении практических задач управления ростом культуры микроводорослей в биотехнологии — в частности, с целью определения оптимальных режимов выращивания микроводорослей для получения определенных целевых продуктов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Работу проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014;35:265–278.
2. Ru I.T.K., Sung Y.Y., Jusoh M., Wahid M.E.A., Nagappan T. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Appl. Phycol.* 2020;1(1):2–11.
3. Cetner M. D., Kalaji H. M., Goltsev V., Aleksandrov V., Kowalczyk K., Borucki W., Jajoo A. Effects of nitrogen-deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. *Plant Physiol. Biochem.* 2017;119:81–92.
4. Chen, L.-H., Xu, M., Cheng, Z., Yang, L.-T. Effects of nitrogen deficiency on the photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant system, and sulfur compounds in *Oryza sativa*. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(19):10409.
5. Karukstis K.K. Chlorophyll fluorescence analysis of photosystem II reaction center heterogeneity. *J. Photochem. Photobiol., B.* 1992;15(1–2):63–74.
6. Terentyev V.V., Shukshina A.K., Ashikhmin A.A., Tikhonov K.G., Shitov A.V. The main structural and functional characteristics of photosystem-II-enriched membranes isolated from wild type and *cia3* mutant *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life.* 2020;10(5):63.
7. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khrushev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A. Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors. *Physiol. Plant.* 2019;165(3):476–486.
8. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics.* 1991;1058(2):87–106.
9. Melis A, Homann P. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 1976;23(5):343–350.
10. Lazar D., Tomek P., Ilik P., Nauš J. Determination of the antenna heterogeneity of photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. *Photosyn. Res.* 2001;68(3):247–257.
11. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Degtereva N.S., Voronova E.N., Volgusheva A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Three-state mathematical model for the assessment of DCMU-treated photosystem II heterogeneity. *Photosynth. Res.* 2024;159:303–320.
12. Дегтерева Н.С., Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Червицов Р.Н., Воронова Е.Н., Яковлева О.В., Антал Т.К., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Оценка гетерогенности антенны и активности кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II математическими методами. *Биофизика.* 2024;69(3):486–497.
13. Беляева Н.Е., Пашенко В.З., Ренгер Г., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Использование модели фотосистемы II для анализа индукционной кривой флуоресценции, вызванной насыщающим световым импульсом, во временном диапазоне 100 нс – 10 с. *Биофизика.* 2006;51(6):976–990.
14. Lazar D., Jablonsky J. On the approaches applied in formulation of a kinetic model of photosystem II: Different approaches lead to different simulations of the chlorophyll *a* fluorescence transients. *J. Theor. Biol.* 2009;257(2):260–269.
15. Беляева Н.Е., Булычев А.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Модель фотосистемы II для анализа нарастания индукционной кривой флуоресценции листьев высших растений. *Биофизика.* 2011;56(3):489–505.
16. Vredenberg W., Prášil O. Modeling of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in plant cells: derivation of a descriptive algorithm. *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 29.* Eds. A. Laisk, L. Nedbal, Govindjee. Dordrecht: Springer; 2009:125–149.
17. Vredenberg W., Prášil O. On the polyphasic quenching kinetics of chlorophyll *a* fluorescence in algae after light pulses of variable length. *Photosynth. Res.* 2013;117(1–3):321–337.
18. Schatz G.H., Brock H., Holzwarth A.R. Picosecond kinetics of fluorescence and absorbance changes in photosystem II particles excited at low photon density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(23):8414–8418.
19. Roelofs T.A., Lee C.-H., Holzwarth A.R. Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts. A new approach to the characterization of the primary processes in photosystem II α - and β -units. *Biophys. J.* 1992;61(5):1147–1163.
20. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Degtereva N.S., Konyukhov I.V., Solovchenko A.E., Kouzmanova M., Goltsev V.N., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion

tion during microalgae cultivation in photobioreactor. *Photosynthetica*. 2020;58(SI):258–266.

21. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Применение флуориметра «Мега-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата. *Вода: химия и экология*. 2009;6(12):34–40.

22. Gizzatkulov N.M., Goryanin I.I., Metelkin E.A., Mogilevskaya E.A., Peskov K.V., Demin O.V. DBSolve Optimum: a software package for kinetic modeling which allows

dynamic visualization of simulation results. *BMC Syst. Biol.* 2010;4(1):109.

23. LMFIT: Non-linear least-squares minimization and curve fitting for Python. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://lmfit.github.io/lmfit-py/intro.html> (дата обращения: 15.04.2025)

Поступила в редакцию 22.04.2025

После доработки 21.08.2025

Принята в печать 14.10.2025

RESEARCH ARTICLE

Estimation of heterogeneity of photosystem II complexes of *Chlorella vulgaris* algae cells under nitrogen starvation using a mathematical model

R.N. Chervitsov* , S.S. Khruschev , P.V. Fursova , T.Yu. Plyusnina 

Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–24 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: roman123qwe123@gmail.com

The study of microalgae cell responses to stress factors such as mineral nutrient deficiency is an important ecological task. Changes in the photosynthetic apparatus are reflected in the kinetics of experimentally measured chlorophyll fluorescence induction curves. Various mathematical methods are developed to analyze changes in the shape of curves, allowing rapid analysis of a large number of curves. The paper demonstrates the use of a simple mathematical model of photosystem II (PSII) to assess changes in the PSII parameters of a *Chlorella vulgaris* microalgae cell culture growing under nitrogen deficiency in the medium. The model describes transitions between three key PSII states that differ in the oxidation state of its components. The mathematical model revealed an increase in the proportion of reaction centers containing smaller antennae, as well as an increase in the proportion of inactive oxygen-releasing complexes.

Keywords: *mathematical model, photosystem II heterogeneity, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, nitrogen starvation, antenna complex, oxygen-evolving complex.*

Funding: This study was performed under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторах

Червицов Роман Николаевич — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: roman123qwe123@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3310-6517>

Хрущев Сергей Сергеевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: styx@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4714-6221>

Фурсова Полина Викторовна — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: fursova@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5426-6141>

Плюснина Татьяна Юрьевна — канд. физ.-мат. наук, доц. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: plusn@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0734-1727>