МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИИ, МАТЕМАТИКИ, ФИЗИКИ, ХИМИИ И МЕДИЦИНЫ



Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Редакционный совет по изданию серии монографий по междисциплинарным вопросам биологии, математики, физики, химии и медицины

> Председатель Редакционного совета: академик В. А. Садовничий

> > Заместитель Председателя: академик А. Б. Рубин

Члены совета: академик М. П. Кирпичников академик В. А. Ткачук академик В. П. Скулачев член-корреспондент Е. А. Гудилин профессор Н. Н. Сысоев профессор В. Н. Чубариков

ГОРИЗОНТЫ БИОФИЗИКИ

TOM 2

Под редакцией академика А. Б. Рубина



Москва • Ижевск

2022

УДК 576.3:51 ББК 28.057в641 Г 50

Γ 50

Горизонты биофизики. Т. 2 / Под ред. А. Б. Рубина. — М.–Ижевск : Институт компьютерных исследований, 2022. — 376 с.

ISBN 978-5-4344-0964-3

Биофизика — междисциплинарная область науки, быстро развивающаяся на стыке биологии, физики, химии, математики. Представленные в книге материалы отражают перспективы развития основных разделов этой науки: молекулярной биофизики, биофизики мембран, биофизики фотобиологических процессов, биоэнергетики, биофизики клеточных процессов, а также экологической и медицинской биофизики. Рассматриваются результаты, полученные в последние годы биофизиками Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и Академии наук России. Представленные данные касаются теоретических основ современной биофизики и их применения для решения фундаментальных и прикладных задач современной биологии.

Книга предназначена для широкого круга ученых и практиков, аспирантов и магистров, специализирующихся в областях, где биофизический подход может быть полезным в изучении живых систем и решении задач медицины, биотехнологии, экологии, альтернативной энергетики.

ISBN 978-5-4344-0950-6 ISBN 978-5-4344-0964-3 (T. 2)

© Ижевский институт компьютерных исследований, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Биофизика клетки

Аллахвердиев С. И. Горизонты искусственного фотосинтеза	9
<i>Булычев А. А., Алова А. В.</i> Харовые водоросли как модель для исследования межклеточных контактов, защитных барьеров и транспортных систем клетки.	48
Вершубский А. В., Тихонов А. Н. Оксигенный фотосинтез: математическое	
моделирование регуляции электронного и протонного транспорта в хлоропластах	68
Мамеоов М. Д., Витухновская Л. А., Милановскии Г. Е., Семенов А. Ю. Влияние трегалозы на перенос зарядов в комплексах фотосистемы 2	96
Давлетшина Л. Н., Локтюшкин А. В., Ловягина Е. Р., Сёмин Б. К.	
Высокоэффективное связывание катионов железа и замещение	
ими катионов марганца в каталитическом центре кислородвыделяющего	
комплекса фотосистемы 2	.119
Лобышев В. И. Физико-химические особенности разбавленных водных	
растворов и их биологическая активность	.138
Надточенко В. А., Айбуш А. В. Методы фемтосекундной лазерной	
спектроскопии в исследовании фотобиологических процессов	.167
Экологиноская биофизика	

Экологическая биофизика

Барцев С. И., Дегерменджи А. Г., Сарангова А. Б., Дегерменджи Н. Н.	
Экологическая биофизика — горизонты развития	.209
Маторин Д. Н. Перспективы применения методов регистрации	
флуоресценции хлорофилла микроводорослей для биоиндикации	
и биотестирования	.258

Медвинский А. Б., Нуриева Н. И., Русаков А. В. Популяционная динамика: эмерджентность, многосвязность, (не)предсказуемость как проявление сложности экосистемных процессов	283
Погосян С. И. Достижения и перспективы экологической биофизики (исследования состояния фитопланктона)	324
Фрисман Е. Я., Неверова Г. П., Жданова О. Л. Простые популяционные модели с очень сложной динамикой: 50 лет исследований в ДВНЦ АН СССР и ДВО РАН	344

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

ГОРИЗОНТЫ ИСКУССТВЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА

*С. И. Аллахвердиев*¹

Сейчас перед человечеством встали две глобальные проблемы: истощение ископаемого топлива на фоне все возрастающего спроса на энергию и ухудшение экологической обстановки. Экологические риски во многом связаны с нерациональным использованием энергетического сырья и сжиганием топлива с большим углеродным следом. Универсальным решением этих проблем является освоение альтернативных возобновляемых и экологически чистых источников энергии, из которых солнечная энергия наиболее доступна. При этом широко распространенные полупроводниковые фотоэлементы не являются оптимальными с точки зрения экономической выгоды и нагрузки на окружающую среду. Используя и имитируя первичные процессы фотосинтеза, можно научиться эффективно и экологично использовать солнечную энергию. Природный фотосинтез можно направить в русло производства биотоплива, в том числе водорода. Гибридные системы, содержащие компоненты фотосинтетического аппарата и неорганические электроды, а также полностью искусственные системы, имитирующие первичные процессы фотосинтеза, могут быть использованы для генерации фотоэлектричества или опять же для производства водорода. В лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН под руководством д. б. н. С. И. Аллахвердиева успешно проводятся изыскания в области искусственного фотосинтеза и биотоплива. В данном обзоре дается краткий аналитической обзор текущей ситуации в сфере преобразования солнечной энергии с помощью естественного или искусственного фотосинтеза. Многие прорывные работы в этом направлении сделаны при участии и под руководством член-корр. РАН, заслуженного деятеля науки РФ, лауреата премии «Глобальная энергия» С. И. Аллахвердиева.

Ключевые слова: искусственный фотосинтез, биотопливо, альтернативные источники энергии, солнечные ячейки, молекулярный водород, катализатор окисления воды, биофотолиз.

Стремительное развитие экономики и рост численности населения на планете особенно в последние годы требует значительного увеличения производства энергии. Предполагается, что численность населения планеты будет увеличиваться на 0,9 % ежегодно и уже в ближайшее время превысит 9 млрд. Увеличение численности населения планеты, несомненно, повлечет за собой все возрастающий спрос на продукты питания, топливо, энергию, необходимую для их производства. Уже в 2040 году спрос на энергию увеличится более чем на 30 % по сравнению с текущим уровнем.

¹ Лаборатория управляемого фотобиосинтеза Института физиологии растений им. А. К. Тимирязев РАН, Москва.

E-mail: suleyman.allakhverdiev@gmail.com

В настоящее время основным источником энергии служат традиционные виды топлива, включая ископаемые ресурсы (каменный уголь, нефть, природный газ, сланцы) и гидроэнергетику. Энергия, получаемая из традиционного топлива (нефть, природный газ, каменный уголь), составляет более 80 % всей энергии, добываемой в мире [Purchase, De Groot, 2015]. На долю ядерного топлива приходится 6 %, а вклад возобновляемых источников энергии не превышает 13 % (рис. 1). Существенным недостатком всех видов ископаемого топлива является их ограниченное количество на планете. Даже если допустить, что будет сохранен текущий уровень потребления запасов ископаемого топлива, то нефти осталось на 50–60 лет, природного газа — на 40–55 лет [Родионов, 2010]. По некоторым ошибочным оценкам предполагается, что каменного угля хватит человечеству более чем на 500 лет, однако более достоверные оценки свидетельствуют о том, что его запасы полностью истощатся через 175 лет.



🗖 Ископаемое топливо 📕 Возобновляемая энергия 🗏 Ядерная энергия

Рис. 1. Процентное соотношение долей источников энергии в глобальном потреблении энергии

Другим не менее значимым для выживания человечества недостатком получения энергии из традиционных видов топлива является негативное воздействие его использования на окружающую среду. Сжигание углеводородного топлива сопровождается значительным увеличением концентрации углекислого газа в атмосфере планеты; вредными выбросами в атмосферу Земли, связанными не только с эмиссией двуокиси углерода, но и других парниковых газов; глобальным потеплением; подкислением океана; и в конечном итоге не просто существенным изменением климата, а причиной настоящей экологической катастрофы [Voloshin et al., 2016], выражающейся в многочисленных негативных проявлениях, оказываемых на природу и человека. Раньше крайне перспективной представлялась атомная энергия, но после произошедших катастроф на атомных электростанциях данный вид энергии стал напрямую ассоциироваться с экологической катастрофой, тем более что до сих пор не созданы эффективные технологии переработки и захоронения радиоактивных веществ. Современные промышленные предприятия энергетики ежегодно выбрасывают на поверхность Земли около 1 млрд т отходов. Неравномерное распределение энергетических ресурсов (представленных традиционными видами топлива) приводит к политической напряженности [Родионов, 2010; Musazade et al., 2018]. В настоящее время продолжает увеличиваться количество крупных промышленных производств и гигантских энергостанций, использующих традиционные виды топлива в качестве источника энергии. Растет также число газо- и нефтепроводов, протяженность которых лишь в России превысила уже 300 000 км. Для каждой нитки нефтепровода необходимо выделять существенные территории для так называемых охранных зон, а также земельные участки, предназначенные для размещения наземных объектов системы нефтепроводов, нарушая биологическое равновесие природных комплексов (биогеоценозов). Если говорить о негативном воздействии на окружающую среду потребляемого ископаемого топлива, то вклад нефти в нарушение экологии составляет 42,6 %, угля — 37,4 % и газа — 20 %. Из-за этого в мире ежегодные потери, связанные с затратами на экологию, составляют 7,5 трлн долларов.

Таким образом, ограничения в запасах ископаемых видов топлива (которые, к сожалению, не возобновляемы), все возрастающие мировые потребности в энергии и негативные климатические изменения на планете чрезвычайно повысили актуальность поиска путей вовлечения в масштабы глобального промышленного производства альтернативных экологически чистых и возобновляемых источников энергии. Поэтому для решения глобальных энергетических проблем в перспективе все больше внимания, средств и поисковых усилий будет уделятся разработке, внедрению, более широкому и более интенсивному использованию разных экологически чистых возобновляемых альтернативных источников энергии (АИЭ).

Альтернативные источники энергии

Кроме традиционной энергетики, в мире происходит постепенное вовлечение в экономику альтернативных экологически чистых источников энергии. В настоящее время считается, что любой вид энергии, производимый из возобновляемых источников (таких как солнечная энергия, энергия ветра, геотермальная энергия, энергия биомассы и гидроэлектроэнергия), использование, производство или добыча которых не наносит вред окружающей среде, не производит ее загрязнение, как это имеет место в процессе сжигания ископаемых видов топлива и, таким образом, является экологически безопасным, может стать одним из основных среди известных в настоящее время источников энергии для человечества в будущем. Как правило, в рамках понятия «экологичные альтернативные источники энергии» рассматриваются шесть ее наиболее распространенных видов: солнечная энергия, энергия ветра, гидроэнергия, геотермальная энергия, энергия, получаемая в результате переработки биомассы в молекулярный водород (MB), и энергия биотоплива (этанол, биодизель). Несмотря на кажущиеся очевидными преимущества указанных выше альтернативных источников энергии, существуют также определенные проблемы, которые необходимо учитывать при выборе наиболее перспективного ее вида с точки зрения экологии и экономической целесообразности.

Среди альтернативных источников энергии интенсивно развивается ветряная энергетика для получения электричества за счет энергии ветра. Однако она имеет определенные недостатки. Энергия воздушных потоков, перерабатываемая в электроэнергию с помощью существующих в настоящее время ветротурбин, оказывает вредное воздействие на окружающую среду за счет генерации низкочастотных звуковых волн (инфразвук), отрицательно влияющих на психику человека, мощность которых определяется скоростью и силой воздушного потока. Кроме того, ветрогенераторы нарушают нормальную миграцию птиц; для размещения системы ветротурбин, как правило, требуются относительно большие площади поверхности, которые могли бы использоваться для других целей.

В последнее время в определенных районах планеты достаточно интенсивно развивается геотермальная энергетика. Для производства геотермальной энергии используется подземное тепло. Геотермальная энергия с минимальным воздействием на окружающую среду может быть использована только в районах, где на поверхности или достаточно близко к поверхности имеются большие геотермальные источники. В России это парогидротермальные месторождения, расположенные на Сахалине и Курилах. Недостатком геотермальной энергетики является отсутствие парогидротермальных месторождений в большинстве регионов планеты. Необходимость глубокого бурения земной коры в других местах планеты для получения доступа к геотермальной энергии ставит под сомнение как экономическую целесообразность этого вида энергии, так и отсутствие отрицательного воздействия на окружающую среду.

Гидроэнергетика, преобразующая энергию масс воды, в основном, накопленных в результате перекрытия рек плотиной на гидроэлектростанциях или энергию приливных волн в электрическую энергию, отрицательно влияет на экологию водных биоресурсов. Наибольший интерес представляет солнечная энергетика, когда непосредственно или относительно опосредованно используется энергия солнечного излучения. К солнечной энергетике с определенной степенью условности можно отнести несколько способов преобразования энергии квантов света в основном в два вида энергии: либо в энергию электрического тока, либо в энергию химических связей разных видов топлива: молекулярного водорода, биоэтанола, биодизеля.

Электричество за счет солнечного излучения получается либо путем прямого преобразования энергии света в разного типа фотоэлементах (так называемых солнечных ячейках), либо опосредованно путем нагревания воды за счет сконцентрированного с помощью соответствующих устройств солнечного излучения в разного рода гелиоконцентраторах до состояния пара, который используется в паровых электростанциях.

В энергию химических связей энергия солнечного излучения преобразуется в процессе природного фотосинтеза. Энергетика, сфокусированная на производстве биотоплива, основывается либо на переработке биомассы, синтезируемой в процессе природного фотосинтеза, либо на переработке клеточных предшественников (определенного типа липидов или жирных кислот), синтезируемых природными или чаще направленно модифицированными штаммами фототрофов. Затем эти предшественники легко преобразуются в разные виды биотоплива, например, биоэтанол, биодизель, биоводород [Voloshin et al., 2016; Rodionova et al., 2017; Bolatkhan et al., 2019, 2020]. Наработка на полях и/или в разного рода биореакторах биомассы разных типов фототрофов позволяет осуществить чрезвычайно эффективное преобразование энергии солнечного излучения в процессе природного фотосинтеза в органическую биомассу. Кроме того, во многих случаях этим способом можно осуществлять эффективную биоремедиацию загрязненных сред (сточных вод, грунтов и т. д.), а также проводить управляемое накопление разного рода биокомпонентов, необходимых для экономики, медицины, ветеринарии, косметологии, диетического питания, производства разного типа добавок к кормам. Таким образом производство биотоплива является в настоящий момент, а также в перспективе, очень многообещающим методом опосредованной солнечной энергетики [Voloshin et al., 2016; Rodionova et al., 2017; Bolatkhan et al., 2019, 2020]. В случае использования направленно модифицированных фототрофов такие измененные системы природного фотосинтеза с определенной степенью достоверности уже можно обозначить как системы искусственного фотосинтеза. В настоящее время интенсивно развивается производство биодизеля, который получают из растительных жиров. При этом разрывается эфирная связь между глицерином и остатками жирных кислот в масле. В результате образуются метиловый эфир жирных кислот и глицерин. Биоэтанол может быть использован для замены газолина. Использование биоэтанола не повышает содержание двуокиси углерода в атмосфере. Для производства биоэтанола используют сахарный тростник, сахарную свеклу, кукурузу и т. д. Выявление, разработка, создание методами генной инженерии и подробные исследования фототрофов, способных эффективно и преимущественно накапливать в клетках предшественников, легко преобразуемых в биотопливо, такое как этанол и биодизель, представляется достаточно перспективным с точки зрения экологии и экономики направлением развития одного из видов опосредованной солнечной энергетики.

В лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН (зав. лаб. д. б. н., профессор С. И. Аллахвердиев) успешно проводятся изыскания во всех указанных выше сферах научного знания, в том числе с использованием синтетических нанокомпонентов, как в виде искусственных интермедиатов на многих ключевых участках растительной клетки и, особенно, фотосинтетического аппарата (ФА), так и в виде наночастиц на основе жизненно значимых для фототрофов микро- и макроэлементов вместо обычных удобрений [Allakhverdiev et al., 2010; Nath et al., 2015; Najafpour et al., 2016а].

Солнечная энергетика (солнечные ячейки)

Как мы уже отмечали, из перечисленных выше альтернативных источников энергии наиболее перспективной представляется солнечная энергия, поскольку энергия Солнца неисчерпаема. Энергия солнечного света, попадающая на нашу планету в течение одного часа, эквивалентна всей энергии, которую использует человечество в течение одного года. По абсолютному значению поставляемой на нашу планету энергии в единицу времени Солнце занимает первое место. Мощность солнечного излучения, достигающего Земли, составляет 100 000 ТВт [Grätzel, 2007]. Ученые и энергетики всего мира сходятся во мнении, что всей энергией, без которой наше существование трудно себе представить, мы обязаны именно Солнцу.

В XIX веке представления о механизмах генерации фототока развивались вместе с совершенствованием техники фотографии. Именно для повышения качества фотографии впервые использовался процесс сенсибилизации (сорбция дополнительного слоя молекул (красителей или сенсибилизаторов) на галогениде серебра для расширения спектральной чувствительности фотоэмульсии), технику которого затем переняли исследователи фотоэлектричества [Grätzel, 2001]. В первых преобразователях индуцированное светом разделение заряда проходило на поверхности раздела металла и жидкого электролита, а не на поверхности раздела полупроводников с разной примесной проводимостью, локализованной в толще кристалла [Grätzel, 2001]. Тем не менее активное изучение проводимости и фоточувствительности полупроводниковых материалов и процессов получения монокристаллов в первой половине XX века предопределило тип и основной материал солнечных элементов, которые смогли занять нишу на энергетическом рынке. Через некоторое время в результате этих экспериментов появились первые твердотельные фотоэлементы на основе кремния в лаборатории Белла в США в 1954 году [Pucker et al., 2012]. С тех пор именно твердотельные полупроводниковые солнечные батареи занимают доминирующее положение на рынке фотоэлементов. Производство первых солнечных батарей сопровождалось очень высокими тратами. По сей день ведутся научные исследования, которые направлены на увеличение эффективности и уменьшение стоимости производства фотоэлементов [Fraas, 2014]. В настоящее время существует достаточное многообразие типов солнечных ячеек, при этом некоторые виды уже успешно зарекомендовали себя на рынке энергетики, а другие до сих пор проходят испытание и доработку в лабораторных условиях [Pandey et al., 2016]. На рисунке 2 представлены данные сайта национальной лаборатории по изучению возобновляемой энергии за 40 лет (National Renewable Energy Laboratory, NREL [National Renewable Energy Laboratory, 2018]) о наилучших показателях, демонстрируемых солнечными ячейками различных типов.

Для преобразования энергии солнечного излучения в энергию электричества в промышленных масштабах используются различные фотопреобразователи — фотоэлементы (солнечные ячейки, СЯ) на основе полупроводников (кремний, кадмий и т. д.); фотоэлементы на основе органических полимеров, тонкопленочные фотоэлементы. В настоящее время также стали интенсивно разрабатываться СЯ на основе органических хромофоров (биологические пигменты и пигмент/белковые комплексы). Полупроводниковые фотоэлементы обладают на данный момент наибольшей эффективностью. В настоящее время лабораторные солнечные ячейки на основе кремния имеют эффективность около 40 %, тогда как эффективность промышленных солнечных ячеек составляет около 20 %. В то же время такие фотоэлементы обладают рядом недостатков, основными из которых являются: их высокая стоимость; проблема утилизации вредных компонентов солнечных ячеек (кадмий).

Естественным, природным процессом преобразования солнечной энергии в другие виды энергии является природный фотосинтез. Фотосинтезирующие организмы научились конвертировать энергию солнечного света в энергию полезных им химических соединений около 3,5 млрд лет назад [Ben-Shem, Frolow, Nelson, 2004]. В настоящее время несомненным является тот факт, что процесс фотосинтеза — это один из самых важных процессов на нашей планете. Стоит отметить, что нефть, газ и уголь также появились благодаря способности фотосинтезирующих организмов захватывать солнечную энергию и использовать ее для создания органических молекул. Преобразование и накопление энергии на планете осуществляют именно фотосинтезирующие растения, а органические



соединения, которые синтезируются ими в процессе природного фотосинтеза, являются первичным продуктом накопления солнечной энергии. Известно, что в процессе природного фотосинтеза энергия квантов поглощенного света превращается в химическую энергию с эффективностью около 100 %, т. е. квантовый выход первичных реакций разделения заряда в ходе фотосинтеза близок к 1. Необходимо отдельно остановиться на одной из крайне важных эволюционных возможностей живой природы нашей планеты, а именно, на процессе окисления воды за счет энергии поглощенного солнечного света, сопровождающимся выделением молекулярного кислорода в оксигенном фотосинтезе. Именно фотоокисление воды оксигенными фототрофами привело к появлению в атмосфере значительного количества молекулярного кислорода, что вызвало формирование защитного озонового слоя, а также вывело биоэнергетику почти всего живого на планете на абсолютно новый уровень аэробного метаболизма. В результате почти все живые организмы получили способность сжигать органическое топливо со значительной степенью эффективности. Фотосинтетический аппарат представляет собой эффективный и слаженно работающий механизм (рис. 3), который является крайне перспективным объектом для моделирования процессов преобразования энергии, а компоненты фотосинтетического аппарата весьма перспективны для их использования в составе солнечных ячеек. Возможная и перспективная альтернатива фотоэлементам на основе полупроводников в солнечной энергетике — это создание и усовершенствование солнечных ячеек на основе компонентов фотосинтетического аппарата. Благодаря высокой эффективности фотоиндуцированного разделения заряда, которое осуществляется в фотосинтетических реакционных центрах, они обоснованно могут рассматриваться в качестве возможных кандидатов на роль фотосенсибилизатора в солнечных ячейках. Именно искусственные фотосистемы, созданные на основе и «по образу и подобию» природного фотосинтеза, представляют сегодня значительный интерес для ученых всего мира в качестве фотокатализаторов в гибридных системах производства молекулярного водорода (рис. 4).

В лабораторных солнечных ячейках на основе компонентов фотосинтетического аппарата используют фотосинтетические структуры различного уровня сложности: от целых бактериальных клеток или препаратов тилакоидных мембран до реакционных центров фотосистем. В данный момент эффективность функционирования искусственных фотосинтезирующих систем достигает лишь 16–17 %. Однако ученые полагают, что повышение эффективности работы таких систем в несколько раз в ближайшее время является вполне решаемой задачей.

Как в прошлые годы, так и в настоящее время научные интересы и усилия лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН (зав. лаб. д. б. н., профессор С. И. Аллахвердиев) направлены на исследование основных принципов



Рис. 3. Цепь переноса электронов при фотосинтезе



Рис. 4. Схема солнечной ячейки на основе компонентов фотосинтетического аппарата

и механизмов естественного, т. е. природного фотосинтеза, используя которые можно было бы разрабатывать и создавать перспективные высокоэффективные устройства для искусственного фотосинтеза с возможностью внедрения их в промышленность. Для повышения эффективности работы таких СЯ в лаборатории используются различные искусственные соединения, биомиметики, заменяющие естественные компоненты ФА, в частности пластохиноны и марганецсодержащий кислородвыделяющий комплекс. Большинство ученых мира уже пришли к заключению о том, что наиболее перспективным направлением развития систем искусственного фотосинтеза могут быть лишь природоподобные технологии. Очевидно, что только благодаря полученным в результате

многолетних исследований знаниям о природном фотосинтезе стали возможны успехи в развитии систем искусственного фотосинтеза, достигнутые в настоящее время, а также ожидаемые в ближайшей и долгосрочной перспективе. Кроме того, ясно, что для разработки и построения таких систем искусственного фотосинтеза необходимы как можно более глубокие, точные и детальные знания, а также экспериментально обоснованное понимание структур и механизмов функционирования природных систем фотосинтеза. Использование биологических систем для преобразования солнечной энергии имеет целый ряд преимуществ. Квантовый выход первичных реакций разделения заряда в ходе природного фотосинтеза близок к 100 %. Отдельные компоненты фотосинтетического аппарата крайне перспективны для их использования в составе солнечных ячеек. Несомненно, что уже в ближайшее время будет успешно решен ряд основных проблем, препятствующих созданию солнечной ячейки на основе компонентов ФА, пригодной для экспериментальной промышленной апробации. К этим проблемам относятся следующие вопросы: (1) как иммобилизовать комплексы ФА на матрице (электроде)? (2) как стабилизировать систему? (3) как повысить ее эффективность? Для иммобилизации компонентов ФА используют гибридные электроды [Musazade et al., 2018]. Существует два типа гибридных электродов: (1) золотой электрод с линкером; (2) электрод на основе диоксида титана без линкера. На золотом электроде белки закреплены посредством специальных молекул-линкеров, которые связываются одним концом с металлическим электродом, а другим концом с аминокислотами белка. Гибридный электрод образован слоем мезоскопического полупроводника, диоксида титана, нанесенного на проводящую поверхность прозрачного электрода [Voloshin et al., 2017]. Белковые комплексы фиксируются в порах диоксида титана без линкеров. Солнечная ячейка, для которой использовали мезоскопический слой полупроводника на основе фотосенсибилизатора-красителя (Dye-sensitized solar cell, DSSC) [Grätzel, 2001], содержит следующие основные компоненты: прозрачные токопроводящие электроды; мезоскопический слой полупроводника (диоксид титана); сенсибилизатор-краситель, энергия возбужденного состояния которого выше дна зоны проводимости диоксида титана; и электролит. Мезоскопический слой диоксида титана, используемый в качестве полупроводника, имеет поры и кристаллы различных размеров (десятки и сотни нм).

С использованием вышеуказанных компонентов в лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН была разработана, создана и исследована солнечная ячейка с иммобилизованными на поверхности диоксида титана фотосинтетическими тилакоидными мембранами. Сделано обоснованное заключение о реальных перспективах такого устройства [Voloshin et al., 2017].

Кроме того, в лаборатории разработан оригинальный золотой электрод, на котором в качестве фотосенсибилизатора были иммобилизованы препараты

 Φ C2. Для увеличения эффективности переноса электронов от Φ C2 к золотому электроду в лаборатории впервые были синтезированы платиновые частицы, связанные с семью молекулами TEGSH и одной молекулой TMQP-бензохинона. Платиновые частицы изначально синтезировались из гексахлорплатиновой кислоты, связанной с 2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этантиол TEGSH. Получившиеся модифицированные наночастицы платины инкубировали с 1-[15-(3,5,6триметил-1,4-бензохинон-2-ил)]пентадецил дисульфидом (TMQ(CH2)15S)2. С целью повышения эффективности генерации фототока комплексы Φ C2 были реконструированы путем замещения нативного переносчика электронов пластохинона Q_в платинизированным пластохиноновым аналогом. Экспериментально показано, что интенсивность генерации фототока в ячейке с модифицированной Φ C2 (т. е. с Pt/ Φ C2 гибридными комплексами) была значительно выше, чем в контроле [Miyachi et al., 2017].

Для того чтобы иметь возможность всесторонне исследовать разные параметры и оценивать эффективность работы СЯ на основе компонентов ФА в условиях, соответствующих реальным условиям промышленного использования, в лаборатории была разработана, спроектирована, создана и успешно апробирована специальная установка, позволяющая изменять условия функционирования СЯ в широком диапазоне температур, интенсивностей и качества света, а также другие условия окружающей среды. Полученные с помощью этой установки данные показывают, что с увеличением интенсивности света (от 40 мкмоль квантов м² с⁻¹) возрастает сила фототока в присутствии фотосенсибилизатора (тилакоидов) и достигает насыщения при интенсивности света около 600 мкмоль квантов м² с⁻¹. Известно, что комплекс Φ C2 и, в особенности, ее водоокисляющий кислородвыделяющий кластер наиболее уязвимы к действию стрессовых факторов. Работами лаборатории экспериментально показано, что для практического использования в системах искусственного фотосинтеза (СЯ) ФС2 может быть успешно модифицирована и/или стабилизирована с помощью целого ряда специальных агентов, что существенно повышает стабильность и эффективность ее работы в составе СЯ [Voloshin et al., 2019]. Эти достижения лаборатории значительно приближают перспективы начала реальной адаптации указанных выше искусственных систем фотосинтеза для экспериментального применения в промышленности.

Водородная энергетика

Основным недостатком большей части альтернативных источников энергии (солнце, ветер, приливные волны) является их непостоянный, мерцающий, прерывистый характер поставки энергии (день сменяется ночью, интенсивность солнечного излучения, достигающего поверхность планеты, вследствие изменчивости атмосферы, сила ветра и приливных волн — непостоянны). В связи с этим остро встает вопрос поиска способа хранения энергии, получаемой от таких альтернативных источников энергии. В итоге многочисленных изысканий исследователи пришли к заключению, что на сегодняшний момент лучшим способ хранения энергии может быть ее хранение в виде молекулярного водорода.

Водородная энергетика обладает целым рядом преимуществ. Молекулярный водород (МВ) признан топливом будущего, поскольку он представляет собой не содержащее углерода самое экологически чистое топливо. МВ не загрязняет окружающую среду, и это позволит экономить до 7,5 трлн долларов в год, которые планета ежегодно тратит на восстановление повреждений экологии вследствие использования традиционных видов топлива. Молекула воды состоит из двух протонов и атома кислорода. Как один из основных компонентов в структуре молекулы воды водород — это широко распространенный, имеющийся на нашей планете в избытке, возобновляемый источник энергии, не дающий при сгорании никаких загрязнений окружающей среды, выделяющий при сжигании большое количество энергии на единицу веса и который может быть легко преобразован в электричество с помощью топливных ячеек. С учетом вышесказанного МВ признан наиболее эффективным и наиболее энергоемким из всех видов топлива. МФ является наиболее удобным для крупномасштабной транспортировки на большие расстояния топливом. При сжигании МВ образуется вода, и не образуются разрушающие озоновый слой химические вещества и парниковые газы.

Получение молекулярного водорода

Молекулярный водород практически не встречается на нашей планете в свободной форме, его приходится извлекать из прочих соединений, в которых он находится в «связанном» виде. Основными методами получения водорода являются: паровая конверсия метана и природного газа; газификация угля; электролиз воды; пиролиз; частичное окисление; биотехнологии. Поскольку считается, что за водородной энергетикой будущее, многие задаются вопросами о том, насколько эффективны и совершенны методы его получения, используемые на сегодняшний день. Ведь сама концепция водородной энергетики подразумевает высокоэффективное промышленное производство водорода, при этом массовость и дешевизна должны быть неотъемлемой частью всей концепции. Именно электролиз воды для получения MB, как правило, пытаются использовать и совершенствовать ученые и изобретатели. В основе метода лежит процесс воздействия на дистиллированную воду электрическим током, вызывая разложение воды на составляющие — кислород и водород: $2H_2O = 2H_2 + O_2$. Причем сам метод довольно старый: известно, что впервые электролитическое

расщепление воды на кислород и водород было осуществлено в 1800 году; а приблизительно еще через столетие началось промышленное освоение этого метода, когда стали доступны генераторы постоянного тока. Несмотря на то, что технология электролиза воды выглядит привлекательно с экологической точки зрения и дает при этом возможность создания установок с широким диапазоном производительности (от нескольких литров до сотен кубометров водорода в час), это очень дорогая технология получения водорода. В совокупности, на нее приходится всего 4–5 % от общего произведенного объема водорода. Но по сей день электролиз воды выигрывает по отношению к остальным старым неэффективным методам получения водорода, он рассматривается как перспективный метод экологически чистого получения водорода при использовании энергии от возобновляемых альтернативных источников энергии.

Кроме фотосинтетического расщепления воды на высокоэнергетичные электроны, протоны и кислород, за счет энергии солнечного излучения некоторые фототрофы способны при участии определенных ферментов осуществлять не менее значимую для разработки систем искусственного фотосинтеза реакцию, а именно, реакцию генерации молекулярного водорода, используя для этого протоны и высокоэнергетичные электроны, получаемые ими в реакции фоторасщепления воды. Уникальность ФС2 заключается в том, что это единственный существующий в природе ферментный комплекс, способный использовать энергию солнечного света для окисления воды до кислорода (O_2), ионов водорода (протонов H^+) и электронов [Govindjee et al., 2010]. Строение и принцип работы ФС2 показан на рисунке 5. Для производства водорода, в том числе



Рис. 5. Строение фотосистемы 2 и кислородвыделяющего комплекса

и с помощью систем искусственного фотосинтеза, необходимы восстанавливающие эквиваленты (высокоэнергетичные электроны) и протоны. Вода единственный существующий в природе в неограниченных объемах возобновляемый источник электронов, уникальность которого заключается в том, что она может быть использована также как единственный существующий в природе в неограниченных объемах возобновляемый источник протонов. Если бы в разрабатываемых системах искусственного фотосинтеза удалось достичь сопряжения реакции фотогенерации протонов и высокоэнергетичных электронов от воды (т. е. реакции фотосинтетического расщепления воды) с реакцией восстановления протонов до молекулярного водорода (H₂), то удалось бы создать цикл уникального, совершенного, неограниченного в объемах производства незагрязняющего окружающую среду топлива [Allakhverdiev et al., 2019, 2010; Nath et al., 2015; Najafpour et al., 2016а]. Усилия исследователей в настоящее время направлены на решение этой задачи.

Очевидно, что сразу пытаться создать полную систему искусственного фотосинтеза полностью имитирующую природный фотосинтез, по крайней мере, сложно, непродуктивно, нецелесообразно. Практичнее решать эту задачу поэтапно, создавая устройства ИФ, моделирующие лишь отдельные частные реакции природного фотосинтеза, но уже доведя их до состояния применимости для промышленного использования и дающего экономически и социально (экология) значимые результаты на каждом таком конкретном этапе. Какие реакции природного фотосинтеза уже сейчас можно успешно использовать или уже используются в системах ИФ? Преобразование энергии квантов электромагнитного излучения (солнечного света) в энергию электрического тока с помощью преобразователей (СЯ), в которых в качестве фотосенсибилизатора используются компоненты фотосинтетического аппарата, о которых мы говорили выше. Обоснованно предполагается, что такие СЯ будут обладать существенными преимуществами по сравнению с используемыми в настоящее время ячейками на основе кремния. Их разработка в данный момент находится на стадии лабораторных исследований. Дешевое и экологичное электричество, получаемое при эксплуатации таких СЯ, может напрямую использоваться для хозяйственных нужд или электрохимического окисления воды с целью промышленного получения Н₂. Кроме фермента для восстановления протонов необходим источник высокоэнергетичных электронов. На первом этапе им может быть экзогенный восстановитель (что не очень привлекательно, потому что недешево) или фотовосстановленный электронами от ФС1 ферредоксин, как это имеет место в природных системах, или же высокоэнергетичные электроны могли бы поставляться от реакционного центра ФС2 (очень перспективно) должным образом сопряженного с гидрогеназой или ее искусственным (более эффективным, более стабильным, более неуязвимым для любых внешних воздействий) аналогом. Над этой задачей сегодня интенсивно работают исследователи. И это вполне реализуемо. Ранее уже в 80-х гг. прошлого столетия в работе профессора С. И. Аллахвердиева с соавторами было показано, что редокс потенциала восстановленного первичного акцептора электрона Φ C2, феофитина вполне достаточно для того, чтобы эффективно восстанавливать эндогенные и экзогенные акцепторы электронов, типичные для Φ C1, такие как ферредоксин, НАДФ, метилвиологен и бензилвиологен [Allakhverdiev, Klimov, 1992]. Более того, авторам удалось показать, что комплексы Φ C2, лишенные водоокисляющего кластера, в присутствии экзогенного донора генерирует молекулярный водород за счет энергии солнечного излучения [Mal'tsev et al., 1988].

Основная проблема в задаче получения неограниченного количества дешевых протонов от воды, которую всесторонне и успешно решают в лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН (зав. лаб. д. б. н., профессор С. И. Аллахвердиев) и многие другие ученые мира, — это поиск, разработка, синтез, исследование и внедрение в данный процесс эффективного, дешевого экологически безопасного, стабильного, создаваемого на основе широко распространенного в земной коре металла. Этот элемент необходимо легко и безопасно для окружающей среды добывать и утилизировать по окончании срока использования. Он же должен являться катализатором реакции окисления воды (на первом этапе пусть электрохимического), имитирующим природный Mn-содержащий кластер кислородвыделяющего комплекса ФС2.

Катализаторы окисления воды

Известно, что процесс окисления воды в случае природного фотосинтеза осуществляется за счет энергии от внешнего источника (в конечном счете, энергии солнечного излучения) при участии специального катализатора, основным компонентом которого выступают 4 атома Мп. Не затрагивая вопрос о внешнем источнике энергии, можно назвать задачу прогнозирования, разработки, сборки и подробных исследований многочисленных катализаторов процесса окисления воды крайне важной. Отметим, что в этом случае мы моделируем лишь одну из реакций природного фотосинтеза. В качестве внешнего источника энергии в данном случае пока служит электричество, а процесс обозначается как электрохимическое окисление воды. Возникает вопрос — так в чем же заключается преимущество такой системы искусственного фотосинтеза? Этот процесс дает неиссякаемый источник протонов, т. е. компонента, из которого состоит молекула водорода и, следовательно, без которого в принципе невозможно в последующем получить молекулярный водород. В качества побочного продукта в этой реакции выделяется кислород, экологически безопасный продукт, причем крайне необходимый для существования всего живого на планете. При этом, получение протонов для генерации молекулярного водорода в реакции электрохимического окисления воды с помощью разрабатываемых катализаторов энергетически и, следовательно, финансово намного дешевле других существующих методов получения протонов (например, путем электролиза воды).

В работах профессора С. И. Аллахвердиева разработана методика поэтапного удаления ионов эндогенного Mn из водоокисляющего комплекса ФС2 (BOK) и последующей реконструкции BOK с помощью MnCl₂ или искусственных Мп-органических комплексов. Экспериментально показано, что каталитический центр водоокисляющего кислородвыделяющего комплекса ФС2 природного фотосинтеза содержит 4 атома марганца, и в дальнейшем эти данные были подтверждены методом рентгеноструктурного анализа. С. И. Аллахвердиевым установлено, что после полного (более чем 95 %) удаления эндогенного Mn из ВОК ФС2 транспорт электронов через ФС2, а также функция фотосинтетического выделения кислорода могут быть вновь восстановлены путем добавления четырех ионов Mn²⁺ на один РЦ (два из которых могут быть заменены ионами Mg²⁺ или ионами других двухвалентных металлов) и последующей фотоактивации системы. Все эти годы в лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР под руководством профессора С. И. Аллахвердиева исследовали и в настоящее время продолжают исследовать широчайший спектр разных металлов и их органических комплексов, которые могли бы быть использованы в качестве катализаторов окисления воды в системах искусственного фотосинтеза [Najafpour et al., 2016a, 2020]. В результате авторы пришли к удивительному заключению, что более подходящего металла для катализа окисления воды, чем тот, который был выбран природой много миллионов лет назад, не существует, и что, очевидно, человечеству в своих изысканиях следует идти по пути создания природоподобных систем искусственного фотосинтеза [Najafpour et al., 2016а, 2020]. Эти работы позволили существенно продвинуть проблему реконструкции ФС2 и создания эффективных катализаторов окисления воды. Основываясь на полученных фундаментальных знаниях о компонентах ФА, в лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР разработаны, синтезированы и подробно исследованы в качестве катализаторов окисления воды многочисленные Mn-, Fe-, Ni-, Ir-, а также Со-, Ru-содержащие комплексы (более 50), являющиеся биомиметиками ФС2 и способные эффективно катализировать расщепление воды на молекулярный кислород и протоны [Feizi et al., 2019; Kalantarifar et al., 2020; Khosravi et al., 2020; Madadkhani et al., 2020; Mehrabani et al., 2020; Mousazade et al., 2019; Najafpour et al., 2014, 2016a-e; 2017a-d; 2018aс; Safdari et al., 2020]. Многие из этих комплексов уже сейчас могут быть использованы для конструирования систем искусственного фотосинтеза. Полученные в лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР результаты и состояние данной проблемы обобщены в нашем обзоре в 2016 г. в Chemical Reviews [Najafpour et al., 2016а]. В этой лаборатории удалось удалить марганец из нативного кислородвыделяющего комплекса Φ C2 и успешно реконструировать полученную апо- Φ C2 с помощью димерного марганцевого комплекса, содержащего различные лиганды [Allakhverdiev et al., 1994а, 1994b; Nagata et al., 2007, 2008; Vitukhnovskaya et al., 2018]. Кроме того, синтезирован трехядерный марганецсодержащий комплекс с различными органическими лигандами, способный после реконструкции с апо- Φ C2 катализировать фотоиндуцированное расщепление воды на молекулярный кислород и протоны [Allakhverdiev et al., 1994a, 1994b; Nagata et al., 2007, 2008; Vitukhnovskaya et al., 2018].

Какими свойствами должен обладать идеальный катализатор окисления воды, и достижение каких из требуемых характеристик предполагается уже в ближайшем будущем? Катализатор должен быть экологически безопасным как в процессе его промышленного использования, так и в процессе добычи, производства, а также утилизации после завершения использования. Катализатор должен быть высокодисперсным, такая высокая дисперсность достигается в том случае, когда катализатор имеет наноразмеры. Катализатор должен обладать способностью к самосборке и самовосстановлению в условиях протекания реакции окисления воды, что гарантировало бы возможность его длительного применения в промышленных системах. Мы установили, что кобальтоксидфосфатный и несколько марганцевых катализаторов обладают этими свойствами. Катализаторы для процесса искусственного фотосинтеза должны быть способны накапливать окислительно-восстановительные эквиваленты, также как это имеет место в кислородвыделяющем комплексе ФС2 природного фотосинтеза [Najafpour et al., 2020]. С учетом указанных требований к катализатору в последние годы внимание исследователей смещено на разработку искусственных кислородвыделяющих комплексов, на основе легкодоступных металлов (Mn, Co, Fe) [Najafpour et al., 2018с]. Наиболее эффективными для искусственного фотосинтеза являются катализаторы на основе марганца, так как этот металл широко распространен в земной коре, а также служит основой каталитического центра КВК в природном фотосинтезе [Najafpour et al., 2020].

Разрабатывается большое количество разных катализаторов на основе оксидов Mn, которые отличаются как структурой каталитического центра, так и структурой органической оболочки. Органическая оболочка определяет степень окисления каталитического центра, являясь существенной частью катализатора. Наилучшие показатели, достигнутые в реакции электрохимического окисления воды в настоящий момент, получены в случае применения в качестве катализаторов этой реакции не просто наноразмерных оксидов металла, а встроенных особым образом в определенный полипептидный каркас [Najafpour et al., 2016b, 2017, 2018a, 2018b; Mousazade et al., 2019]. Предполагается, что исследования подобных наноразмерных композитов (оксид металла(ов)/полипептид) могут в ближайшем будущем обеспечить прорыв в разработке искусственных систем расщепления воды, по многим структурным и функциональным особенностям имитирующих природный КВК ФС2 [Chou et al., 2012].

Весьма важной задачей является разработка полностью неорганических катализаторов, успешным примером которых являются комплексы триоксидов кобальта, координированных и стабилизированных полиоксометалатными лигандами [Feizi et al., 2019].

Еще одним перспективным направлением имитирования природного фотосинтеза в системах искусственного фотосинтеза служит широкий ряд успешных попыток сопряжения наноразмерных синтетических каталитических комплексов с искусственным фотосенсибилизатором (например, на основе бипиридил рутения Ru(bpy)₃³⁺) [Najafpour et al., 2016]. В настоящее время уже известны органические соединения и/или металлорганические комплексы, способные, будучи в возбужденном состоянии, отдавать электрон на искусственный акцептор электронов. Очень перспективным в этом отношении является ион трис(бипиридин) рутения (II), выполняющий в системе искусственного фотосинтеза роль, аналогичную «природному» реакционному центру фотосистемы [Gafney, Adamson, 1972; Maitra et al., 2014].

Прозрачные катализаторы

Кроме указанных выше, практически все разрабатываемые на этом этапе катализаторы электрохимического окисления воды пока еще обладают одним важным недостатком — они «непрозрачны» для того диапазона солнечного излучения, фотоны которого наиболее эффективно поглощаются существующими на данный момент фотосенсибилизаторами, в том числе, пигментами ФА фототрофов. Поэтому, следующим шагом, который будет решен уже в ближайшем будущем в этом направлении, станет разработка высокоэффективных, стабильных, экологически безопасных как при добыче, так и при утилизации катализаторов, основанных на широко распространенных в земной коре элементах и недорогих прозрачных искусственных металлсодержащих и/или иных агентов электрохимического окисления воды. Это позволит перейти от систем электрохимического окисления воды уже к следующему этапу — разработке систем фотохимического расщепления воды, в том числе с участием компонентов ФА в качестве фотосенсибилизаторов. Это исключит необходимость тратить электрическую энергию от разрабатываемых солнечных ячеек на электрохимическое окисление воды. В лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР уже получены обнадеживающие результаты в разработке, синтезе и исследовании прозрачных электродов, способных эффективно катализировать электрохимическое окисление воды, например, на основе моноядерного комплекса фосфина никеля (II) [Azadi et al., 2018, 2019].

Расширение «полезного» диапазона электромагнитного излучения

В ближайшем будущем возможен прорыв и в разработке других подходов к решению проблемы указанной выше «непрозрачности» используемых компонентов (не фотосенсибилизаторов) в системах преобразования энергии солнечного излучения в энергию электрического тока или молекулярного водорода, в том числе и в системах искусственного фотосинтеза. Преодолеть эту проблему можно за счет сдвига или расширения диапазона электромагнитного излучения, используемого конкретной энергопреобразующей системой, промышленное применение которой в данных условиях будет являться экономически оптимальной.

В немного более отдаленной перспективе, несомненно, усилия ученых будут направлены на разработку систем искусственного фотосинтеза, способных с высокой эффективностью преобразовывать энергию квантов электромагнитного излучения не в достаточно узком как в случае природного фотосинтеза диапазоне частот, а в любом из предпочтительных по условиям промышленного применения диапазоне, например с помощью средств, которые уже найдены и достаточно широко исследованы, такие как новые виды хлорофилла «d» и «f» [Аллахвердиев и др., 2016; Schmitt et al., 2019; Kato et al., 2020], способные поглощать фотоны низкой энергии и/или квантовые точки [Pucker et al., 2012]. К таким системам будут выдвинуты требования максимально длительного использования без замены компонентов системы, корректировки ее работы или профилактики. Почему бы не попытаться максимально расширить диапазон используемых источников энергии от гамма- и рентгеновского излучения до радиоволн с частотами до миллиардов герц? Природа сама часто подталкивает исследователей к большей смелости, дерзости в обоснованных мечтаниях, подсказывает решения многих проблем. То, что еще совсем недавно казалось невозможным, устоявшимся, неизменным, буквально через несколько лет воспринимается как уже давно знакомое, естественное, обыденное. Открытие и успехи в исследовании свойств и особенно функций длинноволновых видов хлорофилла «d» и «f» не только существенно расширили наши представления о возможном диапазоне электромагнитного излучения, используемого фототрофами в оксигеном фотосинтезе, но и показали осуществимость казалось бы невозможного — переноса энергии возбуждения против градиента энергий от длинноволновых хлорофиллов «d» («f») к более коротковолновому хлорофиллу «a» в РЦ ФС2 [Аллахвердиев и др., 2016; Schmitt et al., 2019; Kato et al., 2020]. В лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР уже получены обнадеживающие результаты о возможности использования длинноволновых форм хлорофилла «d» и «f», способных поглощать фотоны низкой энергии, для существенного расширения «полезного» диапазона электромагнитного излучения в длинноволновую часть спектра в солнечных ячейках, в которых в качестве фотосенсибилизатора применяются эти виды хлорофилла [Voloshin et al., 2017].

Производство молекулярного водорода с помощью микрофототрофов

Исследователи искали и продолжают искать пути получения альтернативных видов топлива из возобновляемого природного сырья, которым является растительная, животная, микробная биомасса, поскольку в данном случае можно говорить о практически неограниченных запасах. В пользу использования именно биомассы говорит все та же концепция поиска путей получения энергии, не связанная с истощением мировых запасов ископаемого топлива, при этом приводящая к энергосбережению и сокращению выделения в окружающую среду парниковых газов. В данную концепцию полностью укладываются сведения о том, что водород можно получить из практически не ограниченного по запасам источника — отходов сельскохозяйственных предприятий, пищевых и лесоперерабатывающих производств и воды. В последнее время повышенное внимание уделяют также такому виду сырья, как биомасса оксигенных микроорганизмов — микроводорослям и цианобактериям, так как она является перспективным углеводсодержащим субстратом для анаэробного сбраживания бактериями, образующими молекулярный водород [Bolatkhan et al., 2019; Sadvakasova et al., 2019]. Использование способных генерировать молекулярный водород микроорганизмов позволяет одновременно разработать технологию получения водорода и решить проблему переработки отходов путем их микробной конверсии. По механизму образования водорода можно выделить следующие процессы: биофотолиз воды зелеными микроводорослями (прямой) и цианобактериями (непрямой); фоторазложение органических веществ фотосинтезирующими бактериями; темновая ферментация органических веществ анаэробными бактериями (брожение); гибридные системы, в которых используются фотосинтетические и анаэробные бактерии [Bolatkhan et al., 2019; Sadvakasova et al., 2019].

Биофотолиз воды является наиболее привлекательным и эффективным процессом для получения водорода [Марков, 2007]. Зеленые водоросли и цианобактерии способны к выделению молекулярного водорода в фотосинтетических реакциях, для этого они используют воду в качестве источника электронов и протонов, а солнечный свет в качестве источника энергии. Вода и свет выступают практически неистощимыми и возобновляемыми природными ресурсами. Прямой фотолиз воды, который представляет собой ее разложение на водород и кислород с помощью световой энергии, осуществляют зеленые микроводоросли согласно реакции: $2H_2O + hv = 2H_2 + O_2$ [Цыганков, 2006].

Образование молекулярного водорода при прямом биофотолизе воды осуществляется с участием фермента гидрогеназы, чувствительной к кислороду (рис. 6). При непрямом биофотолизе за образование водорода ответственна нитрогеназа и/или гидрогеназа. Оксигенные продуценты водорода используют электроны от ФС1 для восстановления ферредоксина, который, в свою очередь, поставляет электроны для выработки водорода или восстановления НАДФН⁺. Для восстановления протонов до молекулярного водорода гидрогеназы используют непосредственно восстановительные эквиваленты, образовавшиеся в результате световой стадии фотосинтеза, тогда как нитрогеназы получают восстановительные эквиваленты, образующиеся в процессе окисления органических углеводородных соединений, первоначально синтезированных в результате темновой стадии фотосинтеза [Bandyopadhyay et al., 2010]. Кроме цианобактерий и зеленых водорослей, использовать энергию света для производства водорода из органических соединений способны и аноксигенные фототрофные бактерии [Rey et al., 2007]. В случае, когда водород вырабатывается аноксигенными фотосинтезирующими организмами, источником протонов служит органическое вещество, а источником свободной энергии, необходимой для этой реакции, служит солнечный свет [Bandyopadhyay et al., 2010].



Рис. 6. Генерация водорода в клетках микроводорослей. В кислородвыделяющем комплексе (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) происходит фотоиндуцированное окисление воды. В FeFe-гидрогеназе происходит восстановление водорода за счет электронов из фотосистемы 1

Природные гидрогеназы

В фотокаталитических системах молекулярный водород можно генерировать, используя в качестве катализатора природные гидрогеназы, ферменты, способные к активации молекулярного водорода и его окислению, либо восстановлению протонов до молекулярного водорода. С эволюционной точки зрения функция гидрогеназ заключалась в обеспечении жизнедеятельности микроорганизмов в древней атмосфере, насыщенной водородом. В современных реалиях гидрогеназы необходимы для регуляции окислительно-восстановительного потенциала клетки, а также для получения энергии за счет окисления водорода [Hoehler et al., 2001; 2002]. С помощью гидрогеназ возможен сброс избытка восстановительных эквивалентов, образующихся в процессах фотосинтеза и/или брожения, посредством восстановления ими протонов с образованием молекулярного водорода [Vignais et al., 2001]. Водород также может выступать в качестве донора электронов для таких процессов, как фотосинтез, аэробное и анаэробное дыхание [Robson, 2001]. На сегодняшний момент возможности применения гидрогеназ довольно широки: от использования этих ферментов в фотокаталитических системах и топливных элементах для получения энергии до очистки сточных вод от тяжелых металлов и создания различных биосенсоров [Абдуллатыпов, Цыганков, 2013]. На основе строения активного центра фермента выделяют три класса гидрогеназ: [Fe]-гидрогеназы (ранее известные как «неметаллические»), [FeFe]-гидрогеназы и [NiFe]-гидрогеназы [Vignais, Billoud, 2007].

[Fe]-гидрогеназа представляет собой гомодимер с атомом железа в активном центре в качестве каталитически активной составляющей железо-гуанилилпиридинолового кофактора. Кофактор чувствителен к температуре и свету. Данный тип гидрогеназы не содержит Fe-S кластеров [Shima, Thauer, 2007]. [Fe]-гидрогеназы участвуют в восстановлении CO₂ до метана у некоторых Архей; монооксид углерода является конкурентным ингибитором для данных гидрогеназ [Shima, Thauer, 2007; Shima et al., 2008]. Молекулярный кислород вызывает инактивацию [Fe]-гидрогеназы в течение 2–3 мин. К тому же при наличии кислорода не происходит экспрессии гена, ответственного за синтез гидрогеназ. Таким образом, выделение водорода водорослями регистрируется только в бескислородных условиях. Проблема чувствительности гидрогеназ и ее генов к кислороду долгое время замедляла исследования в области выделения водорода зелеными водорослями. Проводились работы по получению их мутантов с нечувствительной или мало чувствительной к кислороду гидрогеназой [Seibert et al., 1998].

[FeFe]-гидрогеназы чаще всего представляют собой димеры, но также встречаются в виде односубъединичных ферментов, иногда количество субъединиц может доходить до четырех [Nicolet et al., 2002; Meyer, 2007]. Данный тип гидрогеназ имеет активный сайт (Н-кластер) и вспомогательные FeSкластеры, которые играют важную роль в процессах переноса электронов к Нкластеру и от него к другим центрам [Vignais et al., 2001]. [FeFe]-гидрогеназы обладают самой высокой каталитической активностью среди всех известных гидрогеназ и, кроме того, являются высокочувствительными к кислороду [Абдуллатыпов, Цыганков, 2013].

[NiFe]-гидрогеназы представляют собой самый обширный класс гидрогеназ. Данные ферменты существуют в виде гетеродимеров, большая субъединица которых содержит атомы никеля и железа в активном центре, а малая субъединица — три FeS-кластера [Nicolet et al., 2002]. По сравнению с [FeFe]гидрогеназами [NiFe]-гидрогеназы менее активны, однако эти ферменты менее чувствительны к кислороду [Albracht, 1994]. В данном классе гидрогеназ также выделяют более активные [NiFeSe]-гидрогеназы, у которых один из цистеинов, координирующих атом никеля в активном центре, заменен на селеноцистеин. Активный центр [NiFe]-гидрогеназ глубоко погружен в молекулу белка, для проникновения субстрата и ингибитора имеются специальные газовые каналы, а также каналы для диффузии протонов и электрона [Lubitz et al., 2014].

Использование нативных гидрогеназ в искусственных системах фотосинтеза затруднено из-за их высокой чувствительности к кислороду. Однако все же удалось добиться некоторых успехов в разработке фотоэлектрохимических устройств на основе тандемов фотосистем и гидрогеназ. Эти системы могут производить молекулярный водород из воды [Sekar, Ramasamy, 2015].

Фотосинтетическое расщепление воды в сочетании с производством водорода, которое катализируется гидрогеназой/нитрогеназой, можно вполне рассматривать в качестве перспективного чистого возобновляемого источника энергии [Allakhverdiev et al., 2009, 2010]. Однако имеет место существенный недостаток: гидрогеназы очень чувствительны к кислороду, который уже через 2-3 мин их инактивирует [Василов, 2009; Марков, 2007]. Поэтому основным требованием к синтезу водорода водорослями является создание анаэробных условий. Интересным и крайне важным является тот факт, что цианобактерии являются единственными организмами, которые могут выделять водород в воздушной атмосфере в присутствии кислорода. Скорость образования ими водорода в несколько раз выше, чем у зеленых микроводорослей. Кроме того, культивирование цианобактерий осуществляется при минимальных требованиях к субстрату. Следует отметить, что для образования водорода гетероцистные цианобактерии подвергают воду серии промежуточных реакций, а не используют ее напрямую, как это делают микроводоросли и цианобактерии без гетероцист [Bolatkhan et al., 2019; Sadvakasova et al., 2019].

Системы генерации молекулярного водорода

На первом этапе промышленная генерация молекулярного водорода уже сейчас могла бы осуществляться упрощенной системой ИФ, за счет неисчерпаемого источника протонов, получаемых в реакции электрохимического окисления воды, и высокоэнергетичных электронов из внешней среды. В такой системе природные высокоэффективные и стрессоустойчивые гидрогеназы или их синтетические аналоги будут катализировать образование молекулярного водорода. На следующем этапе в аналогичной системе ИФ будет использоваться источник высокоэнергетичных электронов от СЯ, построенной на основе компонентов ФА. В настоящее время в экспериментальном лабораторном варианте уже работают системы ИФ, в которых природная ФС2 сопряжена с гидрогеназой. В такой системе за счет энергии солнечного излучения на донорной стороне осуществляется расщепление воды на кислород, протоны и высокоэнергетичные электроны, а на акцепторной стороне происходит восстановление протонов высокоэнергетичными электронами от воды, катализируемое гидрогеназой, причем эти реакции пространственно разделены с помощью соответствующих проницаемых для протонов и непроницаемых для молекул кислорода пленок.

В этом случае одним из основных требований к системам искусственного фотосинтеза, основанного на кислородном фотосинтезе, является пространственное разделение фотокатализатора, окисляющего воду, и (фото)катализатора, синтезирующего молекулярное топливо. В качестве электродов для СЯ на основе компонентов ФА для генерации МВ за счет энергии света служат полупроводники. Полупроводники — наиболее популярные материалы для искусственных устройств, но без определенных модификаций они либо нестабильны, либо неэффективны. Диоксид титана (TiO₂) является стабильным полупроводником преобразования солнечной энергии в химическую, но ему требуется внешний фотокатализатор для окисления воды и/или синтеза топлива [Allakhverdiev et al., 2009]. Имитация природных каталитических центров окисления воды и восстановления протонов при создании стабильных фотокатализаторов — это новое направление в области альтернативной энергетики [Najafpour et al., 2015, 2016а; Allakhverdiev et al., 2020]. Кислородвыделяющий комплекс является природным прототипом катализатора окисления воды, а природная гидрогеназа является основой для разработки катализатора, генерирующего молекулярный водород. Другой путь связан с использованием нативных белковых комплексов (фотосистема 1, фотосистема 2, гидрогеназы) с некоторыми модификациями, позволяющими соединяться с неорганическим субстратом, что повышает их эффективность и долговечность [Najafpour et al., 2015, 2016a; Allakhverdiev et al., 2020]. Схема генерации водорода искусственными системами представлена на рисунке 7.



Рис. 7. Генерация водорода в системе искусственного фотосинтеза. ФС — фотосенсибилизатор, С1 и С2 — катализаторы, реализующие перенос электронов на донорной и акцепторной стороне соответственно, Катокс и Катвосст — катализатор, окисляющий воду и катализатор, восстанавливающий водород, соответственно. Прямые синие стрелки — миграция электронов, MЭ — миграция энергии в антенных комплексах

Существуют также условно полуискусственные системы фотосинтеза, состоящие как из неорганического субстрата, так и из восстановленных или нативных ферментов. Большинство солнечных топливных систем представлены фотоэлектрохимическими элементами, которые производят топливо опосредованно, путем генерации фототока [Musazade et al., 2018]. В таких системах катализаторы соединены друг с другом как проводом, так и через электролит. Возможность генерации фототока часто рассматривается отдельно от возможности получения топлива [Musazade et al., 2018]. Кроме них имеются другие системы, в которых перенос заряда между катализаторами осуществляется через полупроводник или жидкий электролит, их называют искусственным листом [Musazade et al., 2018]. Имеется большое количество данных о возможности выделения фотосинтетических компонентов из цианобактерий или водорослей, способных сохранять фотоиндуцированную активность переноса электронов даже после очистки [Miyachi et al., 2017; Voloshin et al., 2019]. В фотоэлектрохимических ячейках для катализа восстановления Н⁺ обычно используются лакказы — оксидазы, содержащие несколько атомов меди и обладающие низкой субстратной активностью, обнаруженные в растениях, грибах и бактериях. Фиксация пигментно-белковых комплексов на неорганическом субстрате и низкое сечение поглощения монослоя фотосистем — это значимые проблемы в процессе создания биогибридного электрода. Зафиксировать пигментбелковые комплексы можно либо за счет физической адсорбции без специальных нанопроводов, либо путем воссоздания нативной фотосистемы через прикрепление специальной линкерной молекулы к глобуле нативного белка. Этот специальный линкер обеспечивает фотосистеме легкий доступ к субстрату. В некоторых случаях такие линкеры служат в качестве нанопроводов. Для того чтобы фотоэлектроны мигрировали через линкер к электроду, линкер должен заменить собой нативный кофактор, участвующий в переносе электрона. Проблему низкой поглощательной способности монослоя фотосистем можно решить с помощью наноструктурированного электрода [Sekar, Ramasamy, 2015; Voloshin et al., 2017] или использовать многослойные комплексы фотосистемы 2, полученные путем сшивания. Для сшивания можно использовать линкеры с органически функционализированными амфифильными наночастицами платины [Miyachi et al., 2017].

Как было сказано выше, для разработки систем искусственного фотосинтеза не менее значимым фактом является способность фототрофов осуществлять фотосинтетическое расщепление воды на высокоэнергетичные электроны, протоны и кислород в совокупности с «умением» фотосинтезирующих организмов генерировать молекулярный водород. Самое удивительное, что существует реальная возможность объединить эти две реакции природного фотосинтеза в рамках одной фотосистемы, модифицированной соответствующим образом. Еще в 1988 году профессором С. И. Аллахвердиевым с соавторами была экспериментально показана практическая возможность генерации молекулярного водорода комплексами ФС2, лишенными водоокисляющего кластера в присутствии экзогенного донора [Mal'tsev et al., 1988]. Также как и Φ C2, Φ C1 может быть успешно модифицирована с целью повышения ее стабильности и эффективности работы в реакции генерации молекулярного водорода. Для получения фотоводорода в работах лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР ФС1 была модифицирована так, что ее вторичный эндогенный акцептор электрона, витамин К, был замещен на платинизированный нафтохинон (PtNP), что существенно повысило эффективность переноса электрона на электрод. С помощью этой модификации ФС1 удалось создать систему искусственного фотосинтеза, способную производить молекулярный водород за счет энергии света [Miyachi et al., 2017]. Таким образом, в результате исследований этой лаборатории была не только создана солнечная ячейка на основе препаратов тилакоидных мембран и изолированных фотосистем, способная генерировать фототок, но и система искусственного фотосинтеза, способная производить молекулярный водород.

Преобразование энергии солнечного излучения в биотопливо путем накопления и переработки биомассы микрофототрофов

Производство биомассы фотосинтезирующих водорослей в промышленных масштабах в настоящее время является интенсивно развивающимся и перспективным способом решения глобальной проблемы все возрастающего недостатка энергетических ресурсов [Voloshin et al., 2016; Rodionova et al., 2017; Bolatkhan et al., 2019, 2020]. Фототрофные микроводоросли с их исключительным индексом роста способны синтезировать уникальное разнообразие молекул, имеющих высокое экономическое значение для разных отраслей промышленности,

в том числе и для энергетики. Биомасса фотосинтезирующих микроводорослей состоит из богатых энергией соединений, таких как липиды и углеводы. Липиды, триацилглицерины, присутствующие в микроводорослях, пригодны для превращения в биодизель путем переэтерификации. Второй важный компонент этих высокоэффективных природных преобразователей солнечной энергии в энергию химических связей, углеводы, может быть извлечен из биомассы простыми методами и затем использоваться в качестве субстрата для ферментации в микробных ферментационных реакциях, генерирующих биотопливо, такое как биоэтанол, биобутанол, биоводород и биометан [Voloshin et al., 2016; Rodionova et al., 2017; Bolatkhan et al., 2019]. В результате ведущихся научными группами по всему миру обширных и интенсивных исследований возможностей получения чистой энергии на основе устойчивого сырья, фотосинтезирующих микроводорослей, уже в ближайшее время будут выявлены и выделены потенциальные штаммы с устойчивыми характеристиками роста и высокой производительностью желаемых продуктов из природных ресурсов. Это будет сделано путем биоразведки в природе, с последующим скринингом в лабораторных условиях. Также перспективные штаммы будут найдены в имеющихся коллекциях и затем идентифицированы с использованием широкого спектра молекулярных методов. Выявленные прогнозируемо перспективные в указанном выше отношении штаммы будут всесторонне и существенно улучшены путем адаптивной эволюции и/или случайного и/или направленного мутагенеза. В результате этих действий скорость роста и накопления липидов и/или углеводов будут максимально увеличены, в частности за счет оптимизации всех значимых параметров культуры, а также применения различных стратегий технологического проектирования. Таким образом, уже в ближайшем будущем станут доступны результаты исследований, направленных на выявление всех возможностей усовершенствования процессов преобразования полученной биомассы (липидов и/или углеводородов), в соответствии с типом планируемого к получению биотоплива: биоэтанол, биобутанол и биоводород. В этих исследованиях значимое место займут вновь выявленные и/или направленно модифицированные бактериальные штаммы [Voloshin et al., 2016; Rodionova et al., 2017; Bolatkhan et al., 2019, 2020].

Еще одним направлением, обещающим прорыв в ближайшие годы в развитии энергетики на основе модифицированных фотосинтезирующих микроводорослей (представителей искусственного фотобиосинтеза), станет разработка новых технологий и подходов к снижению стоимости производства биомассы за счет создания таких штаммов модифицированных фотомикротрофов, которые способны успешно прогрессировать, перерабатывая промышленные отходы, такие как многочисленные сточные воды и отработанный углекислый газ [Bolatkhan et al., 2019, 2020]. Результаты этих исследований обладают большим
потенциалом, так как могут без существенных финансовых затрат вывести производство «биотоплива» на промышленный уровень и в то же время значительно сократить загрязнение окружающей среды за счет дешевой, эффективной и максимальной переработки и утилизации бросовых, остаточных веществ антропогенных отходов [Bolatkhan et al., 2019, 2020].

Таким образом, уже сейчас энергия солнечного излучения достаточно широко используется в описанных выше разных энергопреобразующих системах, в том числе на основе модифицированных штаммов фототрофов, природоподобных структур, а также фотосинтетических комплексов, еще не содержащих или уже содержащих искусственные неорганические компоненты. Такие солнечные ячейки уже не являются только природными системами фотосинтеза, а с определенной степенью допущения могут быть обозначены как системы «полуискусственного» или искусственного фотосинтеза для производства биотоплива из биомассы (самый популярный способ на сегодняшний день); производства водорода в процессе жизнедеятельности микроводорослей; производстве биотоплива с помощью фотокатализа, выполняемого этими модифицированными биоустройствами. Каждый из этих способов обладает своими преимуществами и недостатками. Топливом будущего признан молекулярный водород, поскольку он представляет собой не содержащую углерод молекулу, выделяющую большую энергию при окислении. Фотоводород можно получить в результате жизнедеятельности микроорганизмов или за счет фотокатализа. Первый способ проще, но обладает низкой эффективностью. Наиболее привлекательными объектами для исследований и разработок в области солнечной энергии являются недорогие, стабильные, эффективные, экологичные, искусственные или полуискусственные системы для производства водорода из воды, основанные на естественном фотосинтезе.

В лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР уже давно интенсивно и успешно ведется работа по выявлению и выделению потенциальных штаммов с устойчивыми характеристиками роста и высокой продуктивностью желаемых продуктов из природных ресурсов (путем биоразведки в природе, с последующим скринингом в лабораторных условиях), а также в имеющихся коллекциях. Проводится их идентификация с использованием молекулярных методов, изучаются множественные функциональные (в том числе характеризующие фотосинтез и ключевые ферментативные реакции клетки) параметры выявленных штаммов. Выполняются работы по их улучшению путем адаптивной эволюции или случайного мутагенеза с целью достичь максимальное увеличение их ростовых свойств и способности к накоплению углеводов за счет оптимизации параметров культуры и применения различных стратегий технологического проектирования. Осуществляется поиск путей и возможностей оптимизации процессов преобразования полученной биомассы в биотопливо, такое как биоэтанол, биобутанол и биоводород с использованием выявленных опытных бактериальных штаммов.

В результате работ лаборатории уже исследован широкий ряд штаммов цианобактерий, с целью выявления штаммов, характеризующихся высокой способностью к генерации молекулярного водорода в темноте и при освещении. Впервые экспериментально показана способность клеток цианобактерий дикого типа Desertifilum sp. IPPAS B-1220 в определенных условиях производить молекулярный водород с достаточно высокой эффективностью в течение относительно продолжительного времени. Найдены условия, способствующие повышению эффективности генерации водорода клетками этих цианобактерий в 1,5 раза [Kossalbayev et al., 2020]. Кроме того, путем обширного первичного скрининга природных вод из горячих источников на наличие липид-аккумулирующих микроводорослей выявлены 5 чистых изолятов микроводорослей со стабильным ростом и исследованы их продуктивность и состав жирных кислот. В результате в качестве перспективного кандидата для производства биодизеля выбран штамм Scenedésmus obliquus sp-21, у которого наибольшая массовая доля насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот составляет 62 % [Sadvakasova et al., 2019].

Таким образом, уже сегодня на основе изучения принципов функционирования ФС2, а также результатов разработки, построения и исследования созданных систем искусственного фотосинтеза, сотрудниками лаборатории управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН (зав. лаб. д. б. н., профессор С. И. Аллахвердиев) выработаны экспериментально обоснованные детальные схемы и последовательности действий по созданию разных по сложности преобразователей солнечной энергии, содержащие донор электрона, акцептор электрона и фотосенсибилизатор. В настоящее время ведутся работы по их практическому воплощению. В случае самого простого преобразователя солнечной энергии порфирин будет использован как фотосенсибилизатор, хиноновые молекулы как акцептор электрона, этанол как донор электрона и ТЕМРО как катализатор. Эта схема имитирует перенос электрона в ФС2. Кроме того, уже удалось модифицировать Q_B сайт на акцепторной стороне ФС2, где Q_B был заменен его хиноновыми аналогами в комплексе с другими молекулами, что увеличивало эффективность переноса электрона. Для разработки систем генерации молекулярного водорода была также проведена реконструкция акцепторной части ФС1. К молекуле пластохинона был присоединен платиновый комплекс, играющий роль гидрогеназы. Основываясь на огромной базе современных научных данных, разработана обобщенная схема биомиметической системы, которая имитирует работу ФС2 в процессе окисления воды и способна к фотовыделению водорода. Основными компонентами такой ячейки являются: светособирающий комплекс; фотосенсибилизатор; система разделения заряда — первичные донор и акцептор; окисляющий катализатор, расщепляющий воду на кислород и протоны; восстановитель, т. е. катализатор, восстанавливающий протоны до водорода. В ближайшее время на основе этих данных будут созданы более совершенные системы искусственного фотосинтеза.

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день развитие нашей цивилизации сопровождается не только выдающимися достижениями в различных областях знаний, но и обострением глобальных проблем человечества. Многие из этих проблем связаны с ростом численности населения и все возрастающей потребностью в энергетических ресурсах для нормального жизнеобеспечения. Имеющиеся на сегодня запасы природного топлива стремительно истощаются, а добыча ресурсов приводит к экологическим катастрофам. Будущее нашей планеты за альтернативными источниками энергии. Процесс фотосинтеза привел к беспрецедентному взрыву биологической активности на нашей планете, позволив жизни процветать и эволюционировать огромными шагами. Кроме того, огромным скачком в истории Земли является появление возможности окислять воду в процессе оксигенного фотосинтеза. Фотосинтез с энергетической точки зрения — это природный процесс превращения солнечной энергии в топливо, а биологическое производство водорода с помощью энергии Солнца является альтернативой химическим и электрохимическим технологиям. Наука не стоит на месте, в наши дни ведется большая работа по совершенствованию и созданию новых, альтернативных путей производства водорода, при этом массовость, дешевизна и экологическая чистота этого процесса являются необходимыми условиями. Старые методы производства водорода не эффективны, а наиболее часто встречающийся электролиз воды отличается высокой степенью дороговизны.

Энергия солнца и вода — это чистые и возобновляемые ресурсы Земли. Будущее человечества за использованием солнечного света, воды и эффективного катализатора для получения дешевого и экологически чистого молекулярного водорода. На сегодняшний момент во всем мире уже достигнуты значительные успехи в создании систем искусственного фотосинтеза, активно ведутся научные работы по совершенствованию таких систем и созданию эффективных катализаторов данного процесса.

Подводя итоги, невозможно не вспомнить судьбоносный отрывок из книги «Таинственный остров» Ж. Верна (1875 г.): «все великие открытия, по какомуто непонятному закону, совпадают и дополняют друг друга. Да, друзья мои, я думаю, что воду когда-нибудь будут употреблять как топливо, что водород и кислород, которые входят в ее состав, будут использованы вместе или поодиночке и явятся неисчерпаемым источником света и тепла, значительно более интенсивным, чем уголь. Придет день, когда котлы паровозов, пароходов и тендеры локомотивов будут вместо угля нагружены сжатыми газами, и они станут гореть в топках с огромной энергией. Итак, нам нечего опасаться. Пока на Земле живут люди, они будут обеспечены всем, и им не придется терпеть недостатка в свете, тепле и продуктах животного, растительного или минерального царства. Повторяю, я думаю, что, когда истощатся залежи каменного угля, человечество будет отапливаться и греться водой. Вода — уголь будущего».

Благодарности

Хочу выразить благодарности моим коллегам и сотрудникам Владимиру Пащенко, Сергею Жармухамедову, Роману Волошину и Айшат Бозиевой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-14-00118).

Литература

- Albracht S. P. Nickel hydrogenases: in search of the active site // Biochim. Biophys. Acta. 1994. Vol. 1188. P. 167–204.
- Allakhverdiev S. I., Klimov V. V. Photoreduction of NADP(+) in photosystem II of higher plants: requirement for manganese // Z. Naturforsch. C. 1992. Vol. 47 (1–2). P. 57–62.
- Allakhverdiev S. I., Karacan M. S., Somer G., Karacan N., Khan E. M., Rane S. Y., Padhye S., Klimov V. V., Renger G. Binuclear manganese (III) complexes as electron donors in D1/D2/cytochrome b559 preparations isolated from spinach photosystem II membrane fragments // Z. Naturforsch. C. 1994a. Vol. 49 (9–10). P. 587–92.
- Allakhverdiev S. I., Karacan M. S., Somer G., Karacan N., Khan E. M., Rane S. Y., Padhye S., Klimov V. V., Renger G. Reconstitution of the water-oxidizing complex in manganese-depleted photosystem II complexes by using synthetic binuclear manganese complexes // Biochemistry. 1994b. Vol. 33 (40). P. 12210–4.
- Allakhverdiev S. I., Kreslavski V. D., Thavasi V., Zharmukhamedov S. K., Klimov V. V., Nagata T., Nishihara H., Ramakrishna S. Hydrogen photoproduction by use of photosynthetic organisms and biomimetic systems // Photochem. Photobiol. Sci. — 2009. — Vol. 8. — P. 148–156.
- Allakhverdiev S. I., Thavasi V., Kreslavski V. D., Zharmukhamedov S. K., Klimov V. V., Ramakrishna S., Los D. A., Mimuro M., Nishihara H., Carpentier R. Photosynthetic hydrogen production // J. Photochem. Photobiol. C. — 2010. — Vol. 11. — P. 87–99.
- Allakhverdiev S. I. Editorial for the special issue on photosynthesis and hydrogen energy research for sustainability-2019 // Photosynth. Res. — 2020. — Vol. 146 (1–3). — P. 1–3.

- Azadi G., Bagheri R., Bikas R., Mousazade Y., Cui J., Song Z., Kinzhybalo V., Shen J. R., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. A transparent electrode with water-oxidizing activity // Internat. J. Hydrogen Energy. — 2018. — Vol. 43 (51). — P. 22896–22904.
- Azadi G., Zand Z., Mousazade Y., Bagheri R., Cui J., Song Z., Bikas R., Wozniak K., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. A tetranuclear nickel(II) complex for water oxidation: Meeting new challenges // Internat. J. Hydrogen Energy. — 2019. — Vol. 44 (5). — P. 2857–2867.
- Bandyopadhyay A., Stöckel J., Min H. et al. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions // Nat. Commun. 2010. Vol. 1. P. 139.
- Ben-Shem A., Frolow F., Nelson N. Evolution of photosystem I From symmetry through pseudosymmetry to asymmetry // FEBS Letters. — 2004. — Vol. 564 (3). — P. 274– 280.
- Bolatkhan K., Kossalbayev B. D., Zayadan B. K., Tomo T., Veziroglu T. N., Allakhverdiev S. I. Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives // Internat. J. Hydrogen Energy. — 2019. — Vol. 44 (12). — P. 5799–5811.
- Bolatkhan K., Sadvakasova A. K., Zayadan B. K., Kakimova A. B., Sarsekeyeva F. K., Kossalbayev B. D., Bozieva A. M., Alwasel S., Allakhverdiev S. I. Prospects for the creation of a waste-free technology for wastewater treatment and utilization of carbon dioxide based on cyanobacteria for biodiesel production // J. Biotechnology. — 2020. — Vol. 324. — P. 162–170.
- Chou L. Y., Liu R., He W., Geh N., Lin Y., Hou E. Y. F., Wang D., Hou H. J. M. Direct oxygen and hydrogen production by water splitting using a robust bioinspired manganeseoxo oligomer complex/tungsten oxide catalytic system // Int. J. Hydrog. Energy. — 2012. — Vol. 37. — P. 8889–8896.
- Fraas L. M. History of Solar Cell Development, in Low-Cost Solar Electric Power. Bellevue: Springer, 2014. — P. 1–12.
- Gafney H. D., Adamson A. W. Excited state Ru(bipyr)₃²⁺ as an electron-transfer reductant // J. Am. Chem. Soc. 1972. Vol. 94. P. 8238–8239.
- Govindjee, Kern J. F., Messinger J., Whitmarsh J. Photosystem II // Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2010. P. 1–15.
- Grätzel M. Photoelectrochemical cells // Nature. 2001. Vol. 414. P. 338–344.
- Grätzel M. Photovoltaic and photoelectrochemical conversion of solar energy // Philosophical transactions. Series A: Mathematical, physical, and engineering sciences. — 2007. — Vol. 365. — P. 993–1005.
- Feizi H., Bagheri R., Song Z., Shen J. R., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. Cobalt/Cobalt Oxide Surface for Water Oxidation // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. — 2019. — Vol. 7 (6). — P. 6093–6105.
- Hoehler T. M., Albert D. B., Alperin M. J., Bebout B. M., Martens C. S., Des Marais D. J. Comparative ecology of H₂ cycling in sedimentary and phototropic ecosystems // Int. J. Gen. Mol. Microbiol. — 2002. — Vol. 81. — P. 575–585.

- Hoehler T. M., Bebout B. M., Des Marais D. J. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth // Nature. 2001. Vol. 412. P. 324–327.
- Kato K., Shinoda T., Nagao R., Akimoto S., Suzuki T., Dohmae N., Chen M., Allakhverdiev S. I., Shen J.-R., Akita F., Miyazaki N., Tomo T. Structural basis for the adaptation and function of chlorophyll f in photosystem I // Nature Communications. — 2020. — Vol. 11, Article number 238.
- Kalantarifar S., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. Water oxidation by a nickel complex: New challenges and an alternative mechanism // Internat. J. of Hydrogen Energy. — 2020. Vol. 45 (58). — P. 33563–33573.
- Khosravi M., Feizi H., Haghighi B., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. Photoelectrochemistry of manganese oxide/mixed phase titanium oxide heterojunction // New J. of Chem. — 2020. — Vol. 44 (8). — P. 3514–3523.
- Kossalbayev B. D., Tomo T., Bolatkhan K., Zayadan B. K., Sadvakasova A. K., Bolatkhan K., Alwasel S., Allakhverdiev S. I. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production // Int. J. of Hydrogen Energy. — 2020. — Vol. 45 (4). — P. 2627–2639.
- Lubitz W., Ogata H., Rudiger O., Reijerse E. Hydrogenases // Chem. Rev. 2014. Vol. 114 (8). P. 4081–4148.
- Madadkhani S., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. An iridium-based nanocomposite prepared from an iridium complex with a hydrocarbon-based ligand // New J. of Chem. — 2020. — Vol. 44 (36). — P. 15636–15645.
- Mal'tsev S. V., Allakhverdiev S. I., Klimov V. V., Krasnovsky A. A. Hydrogen evolution by subchloroplast preparations of photosystem II from pea and spinach // FEBS Lett. 1988. Vol. 240 (1–2). P. 1–5.
- Mehrabani S., Bikas R., Zand Z., Mousazade Y., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. Water splitting by a pentanuclear iron complex // Int. J. of Hydrogen Energy. — 2020. — Vol. 45 (35). — P. 17434–17443.
- Maitra U., Lingampalli S. R., Rao C. N. R. Artificial photosynthesis and the splitting of water to generate hydrogen // Curr. Sci. — 2014. — Vol. 106. — P. 518–527.
- Meyer J. [FeFe]-hydrogenases and their evolution: a genomic perspective // Cell. Mol. Life Sci. 2007. Vol. 64. P. 1063–1084.
- Miyachi M., Ikehira S., Nishiori D., Yamanoi Y., Yamada M., Iwai M., Tomo T., Allakhverdiev S. I., Nishihara H. Photocurrent Generation of Reconstituted Photosystem II on a Self-Assembled Gold Film // Langmuir. — 2017. — Vol. 33 (6). — P. 1351– 1358.
- Miyachi M., Okuzono K., Nishiori D., Yamanoi Y., Tomo T., Iwai M., Allakhverdiev S. I., Nishihara H. A photochemical hydrogen evolution system combining cyanobacterial photosystem I and platinum nanoparticle-terminated molecular wires // Chem. Lett. — 2017. — Vol. 46 (10). — P. 1479–1481.
- Musazade E., Voloshin R., Brady N., Mondal J., Atashova S., Zharmukhamedov S. K., Huseynova I., Ramakrishna S., Najafpour M. M., Shen J. R., Bruce B. D., Allakhverdiev S. I. Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges // J. of Photochem. and Photobiol. C: Photochemistry Reviews. — 2018. — Vol. 35. — P. 134–156.

- Mousazade Y., Najafpour M. M., Bagheri R., Jaglicic Z., Singh J. P., Chae K. H., Song Z., Rodionova M. V., Voloshin R. A., Shen J. R., Ramakrishna S., Allakhverdiev S. I. A manganese(II) phthalocyanine under water-oxidation reaction: new findings // Dalton Transactions. — 2019. — Vol. 48 (32). — P. 12147–12158.
- Nagata T., Nagasawa T., Zharmukhamedov S., Klimov V. V., Allakhverdiev S. I. Reconstitution of the water-oxidizing complex in manganese-depleted photosystem II preparations using synthetic binuclear Mn(II) and Mn(IV) complexes: production of hydrogen peroxide // Photosynth. Res. — 2007. — Vol. 93. — P. 133–138.
- Nagata T., Zharmukhamedov S. K., Khorobrykh A. A., Klimov V. V., Allakhverdiev S. I. Reconstitution of the water-oxidizing complex in manganese-depleted photosystem II preparations using synthetic Mn-complexes: a fluorine-19 NMR study of the reconstitution process // Photosynth. Res. — 2008. — Vol. 98. — P. 277–284.
- Najafpour M. M., Isaloo M. A., Eaton-Rye J. J., Tomo T., Nishihara H., Satoh K., Carpentier R., Shen J. R., Allakhverdiev S. I. Water exchange in manganese-based water-oxidizing catalysts in photosynthetic systems: from the water-oxidizing complex in photosystem II to nano-sized manganese oxides // Biochim. Biophys. Acta. — 2014. — Vol. 1837 (9). — P. 1395–1410.
- Najafpour M. M., Carpentier R., Allakhverdiev S. I. Artificial photosynthesis // J. Photochem. Photobiol. B. — 2015. — Vol. 152 (Pt A). — P. 1–3.
- Najafpour M. M., Renger G., Hołyńska M., Moghaddam A. N., Aro E. M., Carpentier R., Nishihara H., Eaton-Rye J. J., Shen J.-R., Allakhverdiev S. I. Manganese Compounds as Water-Oxidizing Catalysts: From the Natural Water-Oxidizing Complex to Nanosized Manganese Oxide Structures // Chem. Rev. — 2016a. — Vol. 116 (5). — P. 2886–2889.
- Najafpour M. M., Salimi S., Madadkhani S., Hołyńska M., Tomo T., Allakhverdiev S. I. Nanostructured manganese oxide on silica aerogel: a new catalyst toward water oxidation // Photosynth. Res. — 2016. — Vol. 130 (1–3). — P. 225–235.
- Najafpour M. M., Ghobadi M. Z., Sarvi B., Madadkhani S., Sedigh D. J., Rafighi P., Tavahodi M., Allakhverdiev S. I. Polypeptide and Mn-Ca oxide: Toward a biomimetic catalyst for water-splitting systems // Intern. J. Hydr. Energy. — 2016b. — Vol. 41 (12). — P. 5504–5512.
- Najafpour M. M., Madadkhani S., Zand Z., Hołyńska M., Allakhverdiev S. I. An engineered polypeptide around nano-sized manganese-calcium oxide as an artificial water-oxidizing enzyme mimicking natural photosynthesis: Toward artificial enzymes with high active site densities // Inter. J. Hydrogen Energy. — 2016c. — Vol. 41 (40). — P. 17826– 17836.
- Najafpour M. M., Salimi S., Balaghi E. S., Holynska M., Tomo T., Sadr M. H., Soltani B., Shen J.-R., Veziroglu T. N., Allakhverdiev S. I. Nanostructured manganese oxide on frozen smoke: A new water-oxidizing composite // Inter. J. Hydrogen Energy. — 2016d. — Vol. 41 (4). — P. 2466–2476.
- Najafpour M. M., Madadkhani S., Akbarian S., Holynska M., Kompany-Zareh M., Tomo T., Singh J. P., Chae K. H., Allakhverdiev S. I. A new strategy to make an artificial enzyme: Photosystem II around nanosized manganese oxide // Catalysis Science & Technology. — 2017a. — Vol. 7. — P. 4451–4461.

- Najafpour M. M., Heidari S., Balaghi S. E., Holynska M., Sadr M. H., Soltani B., Khatamian M., Larkum A. W., Allakhverdiev S. I. Proposed mechanisms for water oxidation by Photosystem II and nanosized manganese oxides // Biochim. Biophys. Acta. — 2017b. — Vol. 1858 (2). — P. 156–174.
- Najafpour M. M., Madadkhani S., Tomo T., Allakhverdiev S. I. Nanosized Mn oxide/boron nitride composite as a catalyst for water oxidation // New J. of Chem. — 2017c. — Vol. 41. — P. 10627–10633.
- Najafpour M. M., Salimi S., Zand Z., Holynska M., Tomo T., Singh J. P., Chae K. H., Allakhverdiev S. I. Nanosized manganese oxide/holmium oxide: A new composite for water oxidation // New J. of Chem. — 2017d. — Vol. 41 (22). — P. 13732–13741.
- Najafpour M. M., Madadkhani S., Akbarian S., Zand Z., Holynska M., Kompany-Zareh M., Tomo T., Singh J. P., Chae K. H., Allakhverdiev S. I. Links Between peptide and Mn oxide: Nano-sized manganese oxide embedded in a peptide matrix // New J. of Chem. — 2018a. — Vol. 42 (12). — P. 10067–10077.
- Najafpour M. M., Moghaddam N. J., Hassani L., Bagheri R., Song Z., Allakhverdiev S. I. Toward Escherichia coli bacteria-machine for water oxidation // Photosynth Research. — 2018b. — Vol. 136 (2). — P. 257–267.
- Najafpour M. M., Mehrabani S., Bagheri R., Song Z., Shen J. R., Allakhverdiev S. I. An aluminum/cobalt/iron/nickel alloy as a precatalyst for water oxidation // Internat. J. Hydrogen Energy. — 2018c. — Vol. 43 (4). — P. 2083–2090.
- Najafpour M. M., Zaharieva I., Zand Z., Hosseini S. M., Kouzmanova M., Hołynska M., Tranca I., Larkum A. W., Shen J. R., Allakhverdiev S. I. Water-oxidizing complex in Photosystem II: Its structure and relation to manganese-oxide based catalysts // Coordination Chem. Rev. — 2020. — Vol. 409. — P. 213183.
- National Renewable Energy Laboratory. 2018. URL: https://www.nrel.gov/pv/cellefficiency.html
- Nath K., Najafpour M. M., Voloshin R. A., Balaghi S. E., Tyystjarvi E., Timilsina R., Eaton-Rye J. J., Tomo T., Nam H. G., Nishihara H., Ramakrishna S., Shen J.-R., Allakhverdiev S. I. Photobiological hydrogen production and artificial photosynthesis for clean energy: from bio to nanotechnologies // Photosynth. Res. — 2015. — Vol. 126 (2– 3). P. 237–247.
- Nicolet Y., Cavazza C., Fontecilla-Camps J. C. Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution // J. Inorg. Biochem. — 2002. — Vol. 91. — P. 1–8.
- Pandey A. K., Tyagi V. V., Selvaraj J. A., Rahim N. A., Tyagi S. K. Recent advances in solar photovoltaic systems for emerging trends and advanced applications, Renewable and Sustainable Energy Reviews. — Pergamon, 2016. — P. 859–884.
- Pucker G., Serra E., Jestin Y. Silicon Quantum Dots for Photovoltaics, in Quantum Dots A Variety of New Applications / A. Al-Ahmadi (ed.). — Rijeka: InTech, 2012. — P. 59–92.
- Purchase R. L., De Groot H. J. M. Biosolar cells: Global artificial photosynthesis needs responsive matrices with quantum coherent kinetic control for high yield // Interface Focus. — 2015. — Vol. 5. — P. 20150014.

- Rey F. E., Heiniger E. K., Harwood C. S. Redirection of metabolism for biological hydrogen production // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73. P. 1665–1671.
- Robson R. Biodiversity of hydrogenases // Hydrogen as a fuel: learning from nature / Ed. by R. Cammack, M. Frey, R. Robson. London: Taylor & Francis, 2001. P. 9–33.
- Rodionova M. V., Poudyal R. S., Tiwari I., Voloshin R. A., Zharmukhamedov S. K., Nam H. G., Zayadan B. K., Bruce B. D., Hou H. J. M., Allakhverdiev S. I. Biofuel production: Challenges and opportunities // Inter. J. Hydrogen Energy. — 2017. — Vol. 42 (12). — P. 8450–8461.
- Sadvakasova A. K., Akmukhanova N. R., Bolatkhan K., Zayadan B. K., Usserbayeva A. A., Bauenova M. O., Akhmetkaliyeva A. E., Allakhverdiev S. I. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production // International Journal of Hydrogen Energy. — 2019. — Vol. 44 (12). — P. 5844–5853.
- Sadvakasova A. K., Kossalbayev B. D., Zayadan B. K., Bolatkhan K., Alwasel S., Najafpour M. M., Tomo T., Allakhverdiev S. I. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity // Renewable and Sustainable Energy Rev. — 2020. — Vol. 133. — P. 110054.
- Safdari T., Akbari N., Valizadeh A., Bagheri R., Song Z., Allakhverdiev S. I., Najafpour M. M. Iron-nickel oxide: a promising strategy for water-oxidation // New J. of Chem. — 2020. — Vol. 44 (4). — P. 1517–1523.
- Schmitt F. J., Campbell Z. Y., Bui M. V., Huls A., Tomo T., Chen M., Maksimov E. G., Allakhverdiev S. I., Friedrich T. Photosynthesis supported by a chlorophyll f-dependent, entropydriven uphill energy transfer in Halomicronema hongdechloris cells adapted to far-red light // Photosynth. Res. — 2019. — Vol. 139 (1–3). — P. 185–201.
- Seibert M., Flynn T., Benson D., Tracy E., Ghirardi M. Development of Selection and Screening Procedures for Rapid Identification of H₂-Producing Algal Mutants with Increased O₂ Tolerance // Biohydrogen. — Springer, Boston MA, 1998. — P. 227–234.
- Sekar N., Ramasamy R. P. Recent advances in photosynthetic energy conversion // J. of Photochem. and Photobiol. C: Photochemistry Reviews. — 2015. — Vol. 22. — P. 19– 33.
- Shima S., Pilak O., Vogt S., Schick M., Stagni M. S., Meyer-Klaucke W., Warkentin E., Thauer R. K., Ermler U. The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site // Science. — 2008. — Vol. 321. — P. 572–575.
- Shima S., Thauer R. K. A third type of hydrogenase catalyzing H₂-activation // Chem. Rec. 2007. Vol. 7 (1). P. 37–46.
- Vignais P. M., Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview // Chem. Rev. — 2007. — Vol. 107. — P. 4206–4272.
- Vignais P. M., Billoud B., Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases // FEMS Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 25 (4). — P. 455–501.
- Vitukhnovskaya L. A., Zharmukhamedov S. K., Najafpour M. M., Allakhverdiev S. I., Semenov A. Y., Mamedov M. D. Electrogenic reactions in Mn-depleted photosystem II core particles in the presence of synthetic binuclear Mn complexes // Biochem. and Biophys. Res. Comm. — 2018. — Vol. 503 (1). — P. 222–227.

- Voloshin R. A., Rodionova M. V., Zharmukhamedov S. K., Veziroglu N. T., Allakhverdiev S. I. Review: Biofuel production from plant and algal biomass // Internat. J. Hydrogen Energy. 2016. Vol. 41 (39). P. 17257–17273.
- Voloshin R. A., Bedbenov V. S., Gabrielyan D. A., Brady N. G., Kreslavski V. D., Zharmukhamedov S. K., Rodionova M. V., Bruce B. D., Allakhverdiev S. I. Optimization and characterization of TiO₂-based solar cell design using diverse plant pigments // Inter. J. Hydrogen Energy. — 2017. — Vol. 42 (12). — P. 8576–8585.
- Voloshin R. A., Brady N. G., Zharmukhamedov S. K., Feyziyev Y. M., Huseynova I. M., Najafpour M. M., Shen J. R., Veziroglu T. N., Bruce B. D., Allakhverdiev S. I. Influence of osmolytes on the stability of thylakoid based dye sensitized solar cells // Internat. J. of Energy Research. — Wiley Online Library. — 2019. — Vol. 43 (14). — P. 8878–8889.
- Абдуллатыпов А. В., Цыганков А. А. Моделирование пространственной структуры гидрогеназы HydSL пурпурной серной бактерии Thiocapsa roseopersicina BBS // Компьютерные исследования и моделирование. — 2013. — Т. 5 (4). — С. 737–747.
- Аллахвердиев С. И., Креславский В. Д., Жармухамедов С. К., Волошин Р. А., Королькова Д. В., Томо Т., Шэнь Ц.-Р. Хлорофиллы d и f и их роль в первичных процессах фотосинтеза цианобактерий // Биохимия. — 2016. — Т. 81 (3). — С. 315–328.
- Василов Р. Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 4: биоводород // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова. — 2009. — Т. 5, № 1. — С. 35–41.
- Марков С. А. Биоводород: возможное использование водорослей и бактерий для получения молекулярного водорода // Альтернативная энергетика и экология. — 2007. — Т. 1, № 45. — С. 30–35.
- Родионов В. Г. Энергетика. Проблемы Настоящего и Возможности Будущего. М.: ЭНАС, 2010. 352 с.
- Цыганков А. А. Получение водорода биологическим путем // Российский химический журнал. 2006. Т. 50, № 6. С. 26–33.

Horizons of artificial photosynthesis

Suleyman I. Allakhverdiev

PhD in Physics and Mathematics, Doctor of Biological Sciences, Corr.-Mem. of RAS, Honored Scientist of the Russian Federation, laureate of the K. A. Timiryazev Prize of the Russian Academy of Sciences, the Global Energy Prize;
Head of the Laboratory of Controlled Photobiosynthesis of the K. A.Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Now humanity faces two global problems: the depletion of fossil fuels against the backdrop of ever-increasing demand for energy and environmental degradation. Environmental risks are largely associated with the irrational use of energy raw materials and the combustion of fuels with a large carbon footprint. A universal solution to these problems is the development of alternative renewable and environmentally friendly energy sources, of which solar energy is the most accessible. At the same time, widespread semiconductor photocells are not optimal in terms of economic benefits and environmental impact. Using and imitating the primary processes of photosynthesis, one can learn how to use solar energy efficiently and environmentally. Natural photosynthesis can be directed towards the production of biofuels, including hydrogen. Hybrid systems containing components of the photosynthetic apparatus and inorganic electrodes, as well as completely artificial systems that mimic the primary processes of photosynthesis, can be used to generate photoelectricity or, again, to produce hydrogen. In the Laboratory of Controlled Photobiosynthesis at the K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences under the leadership of Allakhverdiev S. I. is successfully carried out research in the field of artificial photosynthesis and biofuels. This review provides a brief analytical overview of the current situation in the field of solar energy conversion using natural or artificial photosynthesis.

Keywords: artificial photosynthesis, biofuel, alternative energy sources, solar cells, molecular hydrogen, water oxidation catalyst, biophotolysis.

ХАРОВЫЕ ВОДОРОСЛИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ, ЗАЩИТНЫХ БАРЬЕРОВ И ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ КЛЕТКИ

*А. А. Булычев, А. В. Алова*¹

Для успешного применения растительных клеток в биотехнологических целях необходимо понимать, каким образом клетка выполняет свои основные жизненные функции. В работе рассмотрены методы и перспективы исследования фундаментальных клеточных процессов, таких как транспорт фотометаболитов от клетки к клетке с преодолением межклеточных барьеров по специализированным узким порам в клеточных стенках, ранние физико-химические ответные реакции на точечные механические повреждения клетки и влияние внутриклеточных гидродинамических взаимодействий на индукционные изменения флуоресценции хлорофилла. Благодаря многим уникальным свойствам, клетки харовых водорослей являются удобным модельным объектом для изучения *in vivo* проницаемости плазмодесм, репарации микроповреждений клеточной стенки, а также для выяснения роли течения цитоплазмы в заживлении ран, регуляции фотосинтеза и флуоресценции хлорофилла в условиях неравномерного флуктуирующего освещения. Клонирование генов *Characeae* открывает новые возможности для изучения молекулярной структуры и функциональных свойств мембранных транспортеров.

Ключевые слова: харовые водоросли, дальний транспорт, течение цитоплазмы, плазмодесмы, клеточная стенка, механические микроповреждения, индукция флуоресценции хлорофилла, светозависимые транспортеры, оболочка хлоропластов, ионные каналы.

Введение

Каждая фотосинтезирующая клетка зеленых растений представляет уникальную фабрику, способную к синтезу органических веществ из воды и присутствующей в воздухе углекислоты. Эти клетки могут служить источником биотоплива и многих других ценных продуктов. Их биосинтетические процессы включают образование исключительно прочных полимеров, благодаря которым клеточные стенки выдерживают внутреннее давление до 10–50 атмосфер. Для успешного использования широких возможностей растительных клеток в биотехнологических целях необходимо понимать, каким образом клетка выполняет свои основные жизненные функции.

¹ Биологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва.

E-mail: bulychev@biophys.msu.ru, annaalova@gmail.com

Обитание растений и водорослей в природных водоемах со слабощелочными значениями рН потенциально сопряжено с нехваткой проникающего в клетки субстрата фотосинтеза — углекислоты. В листьях водных растений и у харовых водорослей этот дефицит устраняется благодаря работе Н⁺-насоса плазматической мембраны, который выводит протоны из цитоплазмы, подкисляет среду у поверхности клетки и переводит тем самым преобладающие в среде ионы бикарбоната в нейтральные молекулы СО₂, которые легко проникают через мембраны. У водных растений, таких как элодея, Н⁺-насосы располагаются на нижней стороне листовой пластинки, тогда как другая сторона отвечает за пассивное поступление Н⁺ внутрь клеток. Освещение вызывает противоположные сдвиги рН на разных сторонах листа; при этом активные выходящие и пассивные входящие потоки Н⁺ оказываются сбалансированными. У водорослей *Chara* баланс H⁺ поддерживается благодаря чередованию по длине клеток зон выведения и поглощения протонов. Встречно направленные светозависимые потоки Н⁺ создают неравномерный продольный профиль рН с перепадами этого показателя от 6,5 до 10 единиц [Bulychev et al., 2001a, 2001b]. Биологическое значение динамичных структур, поддерживаемых только на свету, не ограничивается созданием оптимальных условий для фотосинтеза. Осаждение кристаллов в «щелочных» зонах побегов Characeae служит моделью глобального процесса биокальцификации — отложения солей кальция на поверхности водорослей, приводящего к поглощению СО₂ из атмосферы и образованию донных осадков и коралловых рифов. Внутриклеточная передача сигналов с потоком цитоплазмы на расстояния до 5-10 мм ярко проявляется под кислыми зонами и сильно ослаблена под щелочными зонами [Bulychev, Krupenina, 2019]. О причинах функциональных различий в разных участках внешне однородной клетки высказано немало предположений, но окончательные представления еще не сложились.

Наряду с мобилизацией ресурсов в целях фотоассимиляции CO₂, для стабильного протекания фотосинтеза важно обеспечить отток промежуточных и конечных продуктов к участкам активного роста. Дальний транспорт — один из важнейших сопряженных с фотосинтезом процессов, который во всех случаях включает стадии внутриклеточного переноса метаболитов и их передачи от клетки к клетке. Скорость переноса жидкости по цепочкам клеток флоэмы может достигать впечатляющей величины 1 мм/с (у сахарного тростника). О непрерывном и напряженном межклеточном транспорте веществ говорит возможность накопления в плодах одного дерева до 1000 кг продуктов, поступающих из клеток мезофилла. Передача веществ между растительными клетками в тканях осуществляется благодаря наноразмерным каналам, пронизывающим толщу клеточных стенок, и происходит преимущественно посредством диффузии. Эти узкие поры, называемые плазмодесмами, представляют собой сложные регулируемые системы, включающие непрерывные тяжи цитоплазмы и каналы эндоплазматического ретикулума. Строение плазмодесм описано сравнительно полно, однако их способность к регулируемым изменениям проводимости под действием различных факторов изучена недостаточно. Поскольку дальний транспорт может лимитировать общую скорость фотосинтеза [Bräutigam, Weber, 2011], исследование путей регуляции проводимости плазмодесм становится одной из важных задач биофизики клетки.

Надежность системы дальнего транспорта метаболитов во многом зависит от способности клетки поддерживать целостность ее наружного прочного барьера — клеточной стенки и залечивать небольшие повреждения, возникающие при точечных механических воздействиях под влиянием абиотических и биотических факторов [Bellincampi et al., 2014]. Такая способность особенно важна для гигантских клеток, поскольку гибель одиночного междоузлия означает потерю значительной биомассы всего растения. При крупных повреждениях клеточной стенки высокое внутреннее давление выбрасывает часть цитоплазмы наружу, и возникающий гидродинамический поток выносит органеллы для экстренной закупорки отверстия. В дальнейшем происходит образование особой «раневой» клеточной стенки [Foissner, Wasteneys, 2012]. Процессы, развивающиеся при менее тяжелых механических повреждениях (при раневой поверхности с размерами от долей до нескольких микрометров), охарактеризованы лишь частично. Значительную роль в понимании первичных защитных реакций клетки играют электрохимические датчики, которые позволяют выявить изменения в содержании ионов и кислорода, включая его активные формы, вблизи повреждений микроскопических размеров. Устранению «раневых» дефектов способствует течение цитоплазмы, которое доставляет субстраты для работы ферментных систем, активируемых при повреждении клеточной стенки.

Течение цитоплазмы служит одним из основных способов интеграции метаболизма в клетках гигантских размеров. Пространственные взаимодействия у харовых водорослей проявляются сильнее, чем в листьях растений, поскольку число лимитирующих транспорт межклеточных барьеров в цепочках междоузлий относительно невелико, а скорость течения цитоплазмы достигает наиболее высоких значений. Течение цитоплазмы обеспечивает доставку фотометаболитов в затененные хлоропласты на расстояния до 10 мм от места их образования на ярком свету. Можно ожидать, что латеральный перенос веществ в условиях неравномерного освещения способен модифицировать индукционные процессы фотосинтеза в связи с перераспределением восстановительных эквивалентов и ассимилятов между освещенными и затененными частями междоузлий. Вместе с тем, экспериментальные свидетельства в пользу такой возможности только начинают появляться.

Харовые водоросли служат удобным объектом для исследования внутриклеточного и трансклеточого распространения фотометаболитов, изучения ранних стадий репарации повреждений, а также для понимания природы индукционных изменений фотосинтеза и флуоресценции хлорофилла, протекающих в интервале десятков секунд от момента включения света. Эти водоросли интересны и тем, что относятся к наиболее близким родственникам высших растений. В литературе появляются новые сведения о геноме и индивидуальных белках видов *Chara* [Nishiyama et al., 2018; Pertl-Obermeyer et al., 2018]. Простая геометрия и крупные размеры интернодальных клеток позволяют применять разнообразные экспериментальные воздействия (электростимуляция, микроинъекция, внутриклеточная перфузия, локальное и комбинированное освещение), а однослойная упаковка неподвижных хлоропластов облегчает измерения флуоресценции и оптической плотности на микроучастках отдельной клетки. Ультраструктурная организация этих клеток подробно охарактеризована методами электронной и конфокальной микроскопии. Клетки водорослей Chara, Nitella и Nitellopsis наиболее полно изучены с помощью электрофизиологических методов: для них установлены на функциональном уровне ионные каналы, участвующие в генерации потенциала действия и поддержании светозависимых круговых электрических токов. Новый этап в изучении ионных каналов должен включать идентификацию их белковой структуры и модификацию транспортных свойств на основе сочетания биофизических и молекулярно-генетических подходов.

Перспективы изучения проводимости межклеточных контактов

Плазмодесмы представляют собой тяжи цитоплазмы, проходящие через сквозные отверстия в клеточных стенках, которые объединяют клетки ткани в континуум [Brunkard, Zambryski, 2017]. В этих каналах присутствуют отдельные нити актина, однако их число невелико. Плазмодесмы свободно пропускают вещества с молекулярной массой до 1 кДа, хотя отмечены случаи проницаемости для коньюгатов белок-флуорофор с массой до 45 кДа. В ранних работах для оценки проводимости плазмодесм в клетку инъецировали производные флуоресцеина и следили за их последующим распространением в соседние клетки. Позднее были разработаны системы изучения проницаемости межклеточных пор для флуоресцентно меченых белков [Gerlitz et al., 2018]. Недавно было установлено, что прохождение фотометаболитов через межклеточные барьеры можно отслеживать по изменениям флуоресценции нативного флуорофора — хлорофилла *a* [Bulychev, 2019].

Метод основан на том, что локальное освещение зеленых растительных клеток сопровождается выведением избытка восстановительных эквивалентов из стромы хлоропластов, поскольку образование NADPH при линейном потоке электронов превышает потребности цикла фиксации CO₂, лимитируемые про-

дукцией АТР. Экспортируемые метаболиты попадают в текущую цитоплазму и распространяются с потоком на значительные расстояния. По ходу движения часть восстановителей поступает из потока в затененные хлоропласты, что индуцирует временное восстановление хинонов электрон-транспортной цепи и повышение флуоресценции хлорофилла [Bulychev, Komarova, 2015, 2017а]. Изменения свечения хлоропластов в ответ на освещение отдаленных участков проявляются и при расположении области локального освещения и зоны измерения флуоресценции в соседних междоузлиях. В этом случае сигнальные метаболиты преодолевают межклеточный барьер, образуемый мелкими узловыми клетками. Центральная часть узла, образованная одним слоем уплощенных клеток, представляет кратчайший путь для прохождения веществ между примыкающими междоузлиями [Beilby, 2016].

В ходе опыта сравнивают передачу метаболического сигнала на заданное расстояние в пределах одного междоузлия (сіs-конфигурация, при которой место подведения узкого луча и область измерения флуоресценции находятся в одной клетке), а также при расположении локального луча и зоны измерения в разных междоузлиях (trans-конфигурация). На рис. 1 показан пример влияния ингибитора H^+ -насоса плазмалеммы диэтилстилбестрола (DES, 40 мкМ) на внутриклеточный и трансклеточный перенос фотометаболитов, выявляемый по изменениям флуоресценции F' хлорофилла.





Площадь под кривой изменений F' отражает избыток метаболитов, накопленных в хлоропластах за время прохождения через анализируемую область «пакета» цитоплазмы, состав которой был модифицирован в области локального освещения. При измерениях в сіз-конфигурации параметры ответной реакции F' базальной и апикальной клеток на освещение удаленного участка (амплитуда изменений, площадь под кривой, положение пика от момента включения локального света) были практически одинаковыми. Вместе с тем ответные реакции, наблюдаемые в сіз- и trans-конфигурациях, существенно отличались (рис. 1, a). В приведенном примере площадь под кривой изменений флуоресценции после прохождения сигнала через межклеточный барьер уменьшилась до 26 % относительно этого параметра при измерении в сіз-конфигурации при равных расстояниях от источника света.

Положение пика F' после прохождения метаболита через узловой комплекс сместилось в сторону задержки на 10,5 с, а ширина пика на уровне половины высоты возросла от 23,6 до 26,8 с. Хотя площадь поперечного сечения плазмодесм составляет менее 1 % от общей площади контакта соседних клеток, через эти нанопоры проходит удивительно большое количество фотопродуктов. В перспективе следует выяснить, зависит ли доля проходящих от клетки к клетке метаболитов от скорости течения цитоплазмы. Не исключено, что увеличение времени контакта «цитоплазматического пакета» с зоной расположения плазмодесм может повысить относительное количество проходящих метаболитов.

Обработка интернодальных клеток ингибитором H⁺-насоса (DES) оказывала сравнительно слабое влияние на дистанционную передачу метаболитов в пределах одной клетки, но полностью блокировала их перенос через межклеточный барьер (рис. 1, δ). По-видимому, проводимость плазмодесм зависит от активности H⁺-насоса плазмалеммы, однако влияние DES на проводимость межклеточных пор, возможно, опосредовано и другими механизмами. Об этом говорит тот факт, что щелочные зоны на поверхности клетки, возникающие согласованно с активностью H⁺-насоса, оказались не чувствительны к действию DES. Вместе с тем, устранение щелочных зон под действием ингибитора везикулярного транспорта брефелдина A (BFA) сопровождалось снижением проводимости плазмодесм для фотометаболитов, высвобождаемых в цитоплазму при локальном освещении [Bulychev, Foissner, 2020]. Сильные различия в действии DES на внутриклеточные и трансклеточные стадии микрофлуидного транспорта свидетельствуют о том, что плазмодесмы представляют одно из наиболее чувствительных звеньев в системе дальнего транспорта у растений.

Смещение пика флуоресценции в trans-конфигурации измерений по сравнению с cis-конфигурацией отражает время преодоления межклеточного барьера. Согласно доминирующей в настоящее время гипотезе, вещества проходят через плазмодесмы посредством диффузии. В перспективе представляется важным выяснить, насколько лабильным показателем является смещение пика F' при различных воздействиях. Этот сдвиг отражает время переноса вещества через трансклеточные поры, и на его основе можно оценить коэффициент диффузии в плазмодесмах. Согласно альтернативной точке зрения, плазмодесмы способны пропускать объемный поток жидкости [Jensen, 2018]. Представляет интерес выявить возможные переключения проводимости трансклеточных пор между диффузионным механизмом и сквозным прохождением малых количеств жидкости. Не исключено, что такие переходы возникают лишь при серьезных нарушениях строения плазмодесм.

В сравнении с традиционным анализом проводимости плазмодесм по скорости распространения флуоресцеина и его аналогов от места их инъекции в соседние элементы клеточных цепочек, метод измерения флуоресценции хлорофилла обладает рядом преимуществ. Показателем служит флуоресценция нативных хлоропластов, которые реагируют на прохождение фотометаболитов в потоке цитоплазмы. В ходе опытов непосредственно сравнивают перенос вещества по внутриклеточному и трансклеточному пути в идентичных условиях (интенсивность света, расстояние от места приложения локального светового импульса, состав среды). Транспортируемые метаболиты образуются в физиологических количествах и только в цитоплазме. Отсутствует сопутствующее инъекции повреждение клетки, а также исключена неопределенность локализации флуоресцентного зонда, связанная с возможным попаданием кончика микропипетки как в цитоплазму, так и в вакуоль. Вполне вероятно, что микроинъекция сама по себе серьезно нарушает функцию плазмодесм.

Высокая проводимость межклеточных контактов характерна для боковых ветвей *Chara australis* и *Chara corallina*. Представляется важным сравнить трансклеточное прохождение метаболитов у пресноводных (*Chara*) и солеустойчивых харофитов, таких как *Lamprothamnium*. Эта задача осложняется тем, что узловые участки у *Lamprothamnium* плотно окружены заостренными клетками (спикулы), которые затрудняют подведение оптоволокна в целях локального освещения объекта и затрудняют выбор области измерения флуоресценции.

Пресноводные и солеустойчивые харовые водоросли существенно отличаются по способности регулировать внутреннее гидростатическое (тургорное) давление. Эти различия представляют интерес, поскольку проводимость плазмодесм предположительно регулируется уровнем давления [Park et al., 2019]. Предполагают, что перепад давления между соседними клетками может смещать подвижный центральный комплекс внутри плазмодесмы и вызывать закупорку поры. Высокая чувствительность пропускной способности плазмодесм к осмотическому давлению среды и тургорному давлению выявлена у клеток *Chara*, причем падение проводимости не было связано с созданием транскле-

точного перепада давлений [Bulychev et al., 2020]. Снижение внутреннего давления при добавлении в искусственную прудовую воду 100–200 мМ сорбита приводит к прекращению межклеточного проведения метаболитов, однако проведение полностью восстанавливается при помещении клеток в исходный раствор. Реакции плазмодесм солеустойчивых видов на изменения осмотичности наружной среды, выявляемые по флуоресценции хлорофилла, в настоящее время еще не изучены. Предстоит также разделить осмотическую и солевую компоненты в ответных реакциях проводимости плазмодесм на изменения состава наружной среды.

Физико-химические процессы при микроповреждении клеточной стенки

Клеточные стенки обеспечивают прочную подложку для плазматической мембраны и играют важную роль в жизнедеятельности растительной клетки [Hardham et al., 2007]. Они участвуют в росте клеток, защищают от действия патогенов и вредителей, а также отвечают за поддержание целостности клетки. Высокое внутриклеточное давление плотно прижимает плазмалемму к этому защитному барьеру. Ослабление прочности стенок посредством десорбции кальция вызывает местные выбросы цитоплазмы через разрывы в плазматической мембране [Skobeleva et al., 1996]. Микроскопические нарушения целостности клеточной стенки у междоузлий Chara индуцируют резкие изменения локальной концентрации кислорода и масштабные сдвиги рН в зоне микроукола после латентного периода 20-30 с [Bulychev et al., 2013; Alova et al., 2020]. На протяжении долгого времени введение тонких микроэлектродов в крупные интернодальные клетки представлялось неповреждающим воздействием, и существование многих локальных физико-химических изменений оставалось скрытым. Введение микропипеток не оставляло видимых повреждений, а клетки сохраняли свою жизнеспособность. Разработка и усовершенствование электродных датчиков, имеющих размеры рабочей части от микрометров до нанометров, открыли возможности для подробного изучения локальных процессов, связанных с повреждением [Alova et al., 2020]. Локальное образование щелочных зон в местах микроукола наглядно выявляется также по яркому свечению непроникающего рН-чувствительного красителя флуоресцеин изотиоцианат-декстрана [Bulychev, Foissner, 2017].

Установлено, что ответная реакция наружного pH на микроукол существенно ослабляется при повышении осмотического давления среды и падении гидростатического давления внутри клетки. Чем слабее давление изнутри на клеточную стенку, тем меньшие сдвиги pH и концентрации O₂ индуцирует микроукол. Зависимость ответных реакций от внутреннего давления в клетке позволяет предполагать, что латентный период (от момента укола до резкого изменения наружного pH) обусловлен локальной деформацией клеточной стенки в области повреждения. Можно представить, что плазматическая мембрана вдавливается в полость, оставшуюся после микроукола в механически ослабленной клеточной стенке, и это приводит к растяжению мембраны и активации механочувствительных кальциевых каналов. Действительно, амплитуды изменений pH и содержания O₂ в ответ на укол существенно возрастали при повышении наружной концентрации Ca²⁺ от 0,1 до 1 мМ и снижались при ее понижении в присутствии EGTA [Bulychev et al., 2013; Alova et al., 2020]. Это говорит о том, что поступление Ca²⁺ в цитоплазму участвует в системе реакций, активируемых при микроповреждении клеточной стенки.

Известно, что связывание Ca^{2+} может модулировать работу ферментных систем. Опыты с применением различных ингибиторов метаболизма показали, что возможным участником в реакциях на микроукол является NADPH оксидаза плазмалеммы, которая содержит Ca^{2+} -связывающие EF-домены и осуществляет трансмембранный перенос электронов на кислород с образованием супероксид анион-радикала и перекиси водорода [Suzuki et al., 2011]. Поскольку эти реакции сопряжены с поглощением протонов, их протекание зависит от pH среды и трансмембранного градиента H⁺. Вероятно, по этой причине максимальная амплитуда вызванных уколом сдвигов pH отмечена в участках с высоким содержанием H⁺ (кислые зоны), где трансмембранное распределение протонов находится вдали от электрохимического равновесия. Напротив, вызванные уколом сдвиги pH были незначительными в зонах с низким содержанием H⁺ (щелочные зоны), где распределение H⁺ между цитоплазмой и средой определяется высокой проводимостью мембраны для протонов и приближается к состоянию равновесия.

В перспективе намечено выяснить, влияет ли pH среды на амплитуду поглощения O_2 при микроуколе клеточной стенки. Иначе говоря, представляет интерес сравнение ответных реакций локального уровня O_2 на укол в местах расположения щелочных и кислых зон. Предполагаемая схема процессов при микроповреждении клеточной стенки включает образование перекиси водорода. Современные электрохимические наносенсоры позволят выявить индуцируемые микроуколом изменения концентрации H_2O_2 в ближайшем будущем.

Согласно предложенной схеме [Alova et al., 2020], донором для трансмембранного переноса электронов мембранной оксидазой служит находящийся в цитоплазме субстрат NAD(P)H. Локализация субстрата в цитозоле находит подтверждение при измерениях наружного pH в области микроперфорации под действием локального освещения соседних участков клетки на удалении 1,5–2 мм от точки укола. Как отмечено выше, локальное освещение участка клетки сопровождается выведением в цитоплазму восстановительных эквивалентов, которые движутся в форме плотного пакета вместе с потоком цитоплазмы [Котагоva et al., 2018]. Прохождение такого пакета через область измерения вызывает не только временное возрастание флуоресценции хлорофилла (в связи с накоплением восстановителей в строме), но и переходное возрастание pH в области перфорации [Bulychev, Komarova, 2017b]. В условиях периодического приложения локальных световых импульсов изменения флуоресценции и наружного pH происходят синхронно, хотя изменения флуоресценции слегка опережают по фазе сдвиги pH. Доводы в пользу цитоплазматической локализации субстрата, используемого мембранной оксидазой, полностью соответствуют представлениям о выведении избытка восстановительных эквивалентов из освещаемых хлоропластов. Одна из перспектив дальнейшей проверки предлагаемой схемы состоит в микроинъекции NADPH в цитоплазму. Ожидается, что локальное повышение концентрации NADPH в области микроперфорации должно вызывать повышение наружного pH на стадии медленного восстановления pH от щелочных до нейтральных значений.

Кроме того, эксперименты с микроинъекцией NADPH помогут прояснить свойства светозависимых транспортеров оболочки хлоропластов, которые отвечают за редокс-обмен между стромой и цитозолем. Ожидается, что в условиях темновой инактивации транспортеров оболочки инъекция NADPH не должна смещать редокс-потенциал стромы и влиять на флуоресценцию хлоропластов, тогда как аналогичная инъекция на слабом свету, достаточном для поддержания переносчиков оболочки в активном состоянии, может восстанавливать хиноны электрон-транспортной цепи и повышать свечение хлорофилла. Аналогичные опыты могут стать еще более информативными при успешной микроинъекции NADPH на удалении от места измерения флуоресценции. В этом случае будет доказана доставка восстановительных эквивалентов в область измерений с потоком жидкой фазы.

Роль циклоза и транспортеров оболочки в индукции флуоресценции хлорофилла

Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла содержат обширную информацию о миграции поглощенной энергии из антенны к реакционным центрам, о фотосинтетическом переносе электронов, нефотохимическом тушении возбужденных состояний, активности водорастворимых ферментов стромы и других связанных с фотосинтезом процессах [Stirbet et al., 2014]. Наиболее подробно изучена природа быстрых стадий индукции флуоресценции, известных как OJIPS-переходы. Природа медленных стадий (SMT-переходы) изучена намного меньше, а имеющиеся сведения весьма противоречивы. У цианобактерий стадия возрастания флуоресценции SM при освещении после предварительной темновой адаптации отражает переход фотосинтетического аппарата (ФСА) из состояния 2 в состояние 1, т. е. перераспределение части энергии, поглощаемой фотосистемой 1 в пользу большего поглощения фотосистемой 2 (ФС2). Последующее снижение свечения у цианобактерий на стадии МТ обусловлено развитием нефотохимического тушения в ФС2 [Bernát et al., 2018]. У высших растений переходы состояний ФСА также участвуют в медленных (SMT) стадиях индукции флуоресценции [Mishra et al., 2019]. Однако главную роль в нарастании свечения на фазе SM играет ослабление фотохимического тушения (цит. по [Mishra et al., 2019]). В клетках *Chara* задержанное повышение флуоресценции F' (SM-переход) проявляется очень четко и обусловлено ослаблением фотохимического тушения [Bulychev, Komarova, 2015]. Очевидно, что стадия SM не может быть следствием перехода состояний ФСА (State 2 \rightarrow State 1), как это происходит у цианобактерий и микроводорослей *Chlamydomonas*.

Выявление дальней сигнализации между неподвижными хлоропластами в клетках *Chara* [Bulychev, Komarova, 2015, 2017а] указывает на существование обобщенного пула метаболитов, которые свободно выводятся на свету из хлоропластов в цитозоль и распространяются с потоком жидкости по длине клетки. В связи с этим возникают два вопроса, требующие изучения. (1) Как влияет лабильность состава цитоплазмы и наличие латерально подвижного пула метаболитов на индукционные процессы при фотосинтезе? (2) Совпадают или отличаются по кинетическим характеристикам процессы выведения метаболитов из освещенных пластид и их поступления в слабоосвещенные хлоропласты?

Имеющиеся в настоящее время результаты позволяют предполагать, что экспорт метаболитов начинается на свету достаточно быстро, тогда как поступление метаболитов из цитоплазмы в хлоропласты требует сравнительно долгого периода фотоиндукции. Рабочая гипотеза состоит в том, что локальное освещение клетки после ее переноса из темноты на общий фоновый свет индуцирует экспорт метаболитов в цитоплазму, но модификация состава цитоплазмы не оказывает влияния на флуоресценцию хлоропластов-акцепторов. Создается впечатление, что в начале индукционного периода метаболиты не попадают из цитоплазмы в строму, а их накопление в хлоропластах начинается с минутной задержкой после помещения клетки на слабый фоновый свет. Об этом свидетельствуют опыты с дополнительным зональным освещением области измерения флуоресценции [Bulychev, 2020]. Если эта область оставалась на слабом фоновом свету в период темновой адаптации всей клетки, то ответные изменения флуоресценции на локальное освещение удаленного участка развивались сразу же после перехода к общему фоновому освещению (без латентного периода ~ 1 мин), причем амплитуда изменений флуоресценции была больше, чем в условиях стационарного фонового освещения. Таким образом, передачу сигналов в ответ на локальное освещение удаленного участка после темновой

адаптации клетки удается полностью подавить или усилить в зависимости от индукционного состояния хлоропластов в области измерения. В отличие от этого, уровень фотосинтетической индукции хлоропластов в области приложения локального светового импульса не имел решающего значения.

Различия в лаг-периодах выведения фотометаболитов из хлоропластовдоноров и их поступления в хлоропласты-акцепторы могут потенциально определяться высокой интенсивностью локального импульса света и, соответственно, низкой интенсивностью фонового освещения в зонах расположения этих органелл. В связи с этим в ряде опытов исключили действие интенсивного импульса света и измеряли индукционные изменения флуоресценции после переноса адаптированной к темноте клетки на слабый фоновый свет. Перед опытом хлоропласты-акцепторы переводили в состояние либо с неактивными транспортерами оболочки (после 5-минутной экспозиции всей клетки в темноте), либо в активное состояние (выдерживание в темноте всей клетки за исключением области измерения флуоресценции, которая оставалась экспонированной локально на фоновом свету). Переход к общему освещению всей клетки после указанных вариантов предобработки вызывал индукционные изменения флуоресценции с выраженной медленной стадией SMT, однако фронт нарастания SM в опытах со световой активацией анализируемых хлоропластов развивался примерно на 50 с раньше, чем без такой активации.

Результаты говорят о том, что хлоропласты с неактивными светозависимыми ферментами, в отличие от пластид с активными ферментами, значительно дольше остаются нечувствительными к повышенному содержанию фотометаболитов в цитоплазме. Такая задержка ответной реакции флуоресценции *F'* на повышение содержания метаболитов в цитоплазме указывает на отсутствие обмена через мембраны оболочки хлоропластов. В свою очередь, уровень трансмембранного обмена определяется функциональным состоянием мембранных транспортеров и градиентом концентрации метаболитов. Экспорт и импорт метаболитов предположительно опосредованы общими транслокаторами оболочки. В таком случае различное время задержки этих процессов может определяться разными градиентами редокс-агентов в цикле переноса. Высокое содержание NADPH в строме освещенных хлоропластов и низкое содержание восстановительных эквивалентов в цитозоле [Lim et al., 2020] могут способствовать более раннему началу экспорта метаболитов по сравнению с их поступлением в соседние хлоропласты.

Транспортеры оболочки работают в сопряжении с латеральным переносом веществ. Интенсивный поток жидкости проходит в непосредственной близости к неподвижным хлоропластам и постоянно обновляет состав прилегающих к ним слоев. Остановка потока может существенно повлиять на скорость трансмембранного обмена в связи с нарушением градиентов транспортируемых веществ. О влиянии движения цитоплазмы на индукционные кривые флуоресценции в условиях равномерного и неравномерного освещения можно судить, используя клетки с нормальным и остановленным потоком жидкости. Измерения в отсутствии и присутствии цитохалазина D выявили разные модификации индукционных кривых флуоресценции после остановки течения цитоплазмы при разных вариантах освещения.

Перенос интернодальной клетки из темноты на свет (переход $T \rightarrow C_{\text{обш}}$) индуцировал SMT-изменения, внешне сходные у клеток с активным и остановленным течением цитоплазмы (рис. 2, а). Однако при отсутствии потока изменения флуоресценции F' начинались существенно раньше, чем в клетках с нормальным течением цитоплазмы. Локальное освещение области измерения после темновой адаптации всей клетки (переход $T \to C_{\text{лок}}$) не вызывало изменений флуоресценции при активном потоке жидкой фазы, но вызывало SMT-переходы, такие же как при общем освещении в условиях подавления потока (рис. 2, б). Если темновой инкубации подвергали всю клетку, за исключением области измерения, которая оставалась на фоновом свету, то переход к общему освещению ($C_{\text{пок}} \rightarrow C_{\text{обш}}$) вызывал индукционные изменения F' большой амплитуды в клетках с интенсивным течением цитоплазмы, но почти не смещал F'в отсутствие циклоза (рис. 2, в). Эти данные свидетельствуют о существенном влиянии дальних внутриклеточных взаимодействий на индукционные процессы фотосинтеза в клетках с активным течением цитоплазмы и об устранении таких взаимодействий при остановке ротационного потока жидкости. Незначительная



Рис. 2. Медленные изменения флуоресценции хлорофилла, индуцированные в клетках с активным и остановленным потоком при разных световых воздействиях: (а) общее фоновое освещение клетки после 5-минутной инкубации в темноте; (б) локальное освещение области измерения флуоресценции после 5-минутной инкубации всей клетки в темноте; (в) переход от локального освещения области измерения (5-минутная предварительная экспозиция) к фоновому освещению всей клетки. 1 — контрольные условия с активным потоком цитоплазмы; 2 — после прекращения потока в присутствии 16 мкМ цитохалазина D (CD). Момент времени t = 0 соответствует смене световых условий

амплитуда стадии SM в индукционной кривой при локальном освещении области измерения свечения говорит о низкой концентрации фотометаболитов в цитоплазме, поскольку большинство хлоропластов, находясь в темноте, остаются неактивными и не оказывают влияния на состав цитоплазмы. При этом накопления NADPH в строме за счет внутренних процессов в области освещения не происходит, так как избыток восстановителей эффективно удаляется из хлоропластов и окружающих их слоев за счет быстрого протока жидкости.

В дальнейшем предстоит разработать математическую модель, позволяющую имитировать влияние дальних взаимодействий и их нарушения на индукционные кривые флуоресценции в клетках с интенсивным жидкостным потоком. Это позволит понять роль микрофлуидных потоков и светозависимых транспортеров плазмалеммы в механизмах медленных стадий индукционных изменений флуоресценции и фотосинтеза.

Перспективы молекулярно-биофизических исследований ионных каналов

Благодаря крупным размерам междоузлий, возможностям внутриклеточной перфузии и относительной простоте проведения экспериментов, харовые водоросли широко применяли для изучения возбудимости и мембранных свойств растительных клеток. С появлением новых методов изучения ионных каналов (метод пэтч-кламп, [Sakmann, Neher, 1984]) в круг объектов, наравне с клетками харовых водорослей, вошли протопласты высших растений. Секвенирование генома *Arabidopsis* в начале 2000 г. (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) открыло возможность создания мутантных линий для изучения функций конкретных генов, а харовые водоросли как объект изучения ионных каналов стали терять свою популярность. Однако вскоре был секвенирован и опубликован геном харовой водоросли *Chara braunii* [Nishiyama et al., 2018] и появились сведения о транскриптоме *Chara australis* [Pertl-Obermeyer et al., 2018]. Полученные данные открывают широкие возможности для идентификации молекулярной природы ионных транспортеров и каналов харовых водорослей.

Исследования функции индивидуальных белков актуальны и для понимания эволюционного развития мембранных систем. Так как харовые водоросли считаются близкими родственниками высших растений, изучение молекулярных основ переноса ионов через плазматическую и вакуолярную мембраны позволит лучше понять механизмы генерации потенциала действия, солеустойчивости, зонообразования (формирования кислых и щелочных зон снаружи клетки), поддержания и регуляции тургорного давления, а также способы усвоения неорганического углерода и ответы клеток на механический стресс.

В геноме *Chara braunii* с помощью анализа по гомологии с изученными каналами были идентифицированы многие ион-транспортирующие мембранные

белки [Nishiyama et al., 2018]. Отрицательный мембранный потенциал плазмалеммы поддерживается за счет работы Н⁺-АТФазы Р-типа, чья гомологичная последовательность была найдена в геноме харовой водоросли. Известно, что кальциевые и хлорные каналы ответственны за фазу деполяризации при генерации потенциала действия, в то время как выход К⁺ из клетки способствует реполяризации мембранного потенциала. Среди генов Chara braunii не были обнаружены потенциал-зависимые натриевые или кальциевые каналы, однако был найден один ген, гомологичный анионным каналам семейства ALMT (aluminum-activated malate transporters). Каналы данного типа впервые были выделены из пшеницы (Triticum aestivum L.), а затем из арабидопсиса. Кодируемые этими генами трансмембранные белки функционируют как анионные каналы и выполняют множество функций, включая массивный отток органических и неорганических анионов из клетки. Среди транспортеров, участвующих в деполяризации мембраны при возбуждении клетки, возможно, присутствуют аноктамин-подобные каналы, которые активируются кальцием, чувствительны к сдвигам напряжения и проводят хлорный ток [Tian et al., 2012]. В фазе реполяризации мембранного потенциала при развитии потенциала действия, когда происходит отток К⁺ из клетки, возможно, участвует потенциал-зависимый К⁺-канал типа Shaker, также найденный по гомологии в данных генома Chara braunii. Сходства и различия механизмов генерации потенциала действия в клетках харовых водорослей и цветковых растений требуют более детального изучения и представляют собой важное направление исследований.

Идентификация мембранных транспортных систем, активируемых при растяжении мембраны, позволит лучше понять механизмы чувствительности харовых к механическим воздействиям. Так, в геноме *Chara braunii* выявлены несколько механочувстительных каналов: два члена семейства MscS-подобных (MSL) каналов, а также ортолог каналов типа Piezo, описанных для клеток эукариот. По нашим представлениям, за образование щелочной зоны с пониженным содержанием кислорода в месте микроповреждения клеточной стенки отвечает NADPH-оксидаза. Ген, кодирующий такой белок, также был обнаружен в геноме *Chara braunii*.

Приведенные примеры показывают, что уже идентифицировано достаточно много генов, которые требуют исследования и характеризации биофизических свойств и функций в организме. Необходимо показать, что ген кодирует функционально активный канал или транспортер. Эта стадия крайне важна, поскольку не всегда последовательность нуклеотидов корректно предсказывает функцию белка.

Для изучения ионных каналов на молекулярно-генетическом и функциональном уровнях используют гетерологическую экспрессию, которую проводят в ооцитах лягушки или клетках млекопитающих (НЕК293, COS7 и т. д.). На

рис. З приведены изображения ооцитов лягушки после инъекции водой или РНК, кодирующей нативный и флуоресцентно-меченый АLMT-подобный канал, идентифицированный в геноме C. braunii. Предварительные данные свидетельствуют о возможности экспрессии интересующего гена, однако детальные электрофизиологические исследования осложняются рядом факторов. Трансфекция и последующая экспрессия идентифицированных генов харовых водорослей требуют оптимизации, поскольку фолдинг и пострансляционная модификация белков могут отличаться в животных и растительных клетках. Кроме того, в клетках лягушек присутствуют Ca²⁺-активируемые хлорные каналы, которые по своим характеристикам схожи с каналами харовых водорослей, участвующими в развитии потенциала действия. Проведение измерений с помощью двухэлектродного метода фиксации потенциала показало активацию не только гетерологически экспрессируемых каналов С. braunii, но и собственных каналов ооцитов. Таким образом, важно подбирать систему для экспрессии, которая не имела бы каналов с характеристиками, схожими с исследуемыми белками.

Ооцит, инъецированный водой (контроль)



Ооцит, инъецированный РНК, канал из С. braunii (CbALMT)



Ооцит, инъецированный РНК, кодирующей ALMT-подобный содержащей последовательность YFP на C-конце CbALMT



Рис. 3. Визуализация ALMT-подобного канала Chara braunii, экспрессированного в ооцитах лягушки

Лимитирующим фактором при проведении молекулярно-генетических исследований на харовых водорослях является отсутствие разработанных протоколов сверхэкспрессии или временного подавления экспрессии генов на уровне одиночной клетки, а также отсутствие методов создания мутантных растений, как это делается для арабидопсиса. В литературе есть две статьи об успешной экспрессии в интернодальных клетках харовых водорослей белков, которые исходно в ней не содержатся. Однако до настоящего времени отсутствуют данные об успешном подавлении экспрессии генов в клетках Characeae. Для этого можно было бы использовать подход РНК-интерференции. Молекула микроРНК способна формировать двухцепочечную структуру и активировать механизм РНК-интерференции для подавления синтеза белков. Двухцепочечная РНК связывается с белковым комплексом Dicer, который разрезает ее на фрагменты. Другой белковый комплекс, RISC, присоединяет эти фрагменты. Одна из цепей РНК удаляется, а вторая остается в составе комплекса RISC и служит для детекции молекул мРНК с гомологичной последовательностью. Если молекула мРНК связалась с фрагментом РНК в RISC комплексе, то он ее расщепляет и удаляет. Таким образом, можно добиться подавления экспрессии определенных генов и уменьшения количества белков, кодируемых этими генами. Анализ по гомологии показал присутствие необходимых молекулярных компонентов механизма РНК интерференции в составе генома *C. braunii*. Это позволяет с оптимизмом рассматривать данный подход в качестве способа подтвердить функцию исследуемых каналов в клетках харовых водорослей.

Таким образом, намечены два главных направления развития молекулярногенетических и биофизических исследований ионных каналов харовых водорослей. С одной стороны, это биоинформационный анализ генома Chara braunii с последующим клонированием и гетерологической экспрессией каналов, идентифицированных по гомологии с ион-транспортирующими системами из других организмов. Это позволит охарактеризовать молекулярную природу и биофизические свойства исследуемых ионных каналов. С другой стороны, важно разработать принципы и подходы для манипуляции экспрессией генов в клетках харовых водорослей, которые способствовали бы как усилению экспрессии, так и подавлению исследуемых генов. Сравнительный анализ нативных клеток и клеток с измененным уровнем экспрессии генов позволит раскрыть биологическую роль исследуемых ион-проводящих систем и других белков, важных для жизнедеятельности клеток растений. Успехи в развитии этих двух направлений будут взаимодополнять наше понимание молекулярных основ функционирования растительных объектов, позволят глубже заглянуть в основы мембранных процессов у харовых водорослей. Сравнение особенностей функционирования ион-транспортирующих мембранных белков в клетках Characeae и других растений поможет раскрыть приобретенные в ходе эволюции изменения, которые позволили растениям приспособиться к изменяющимся условиям среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-12015), а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Литература

Alova A., Erofeev A., Gorelkin P., Bibikova T., Korchev Yu., Majouga A., Bulychev A. Prolonged oxygen depletion in microwounded cells of *Chara corallina* detected with novel oxygen nanosensors // J. Exp. Bot. — 2020. — Vol. 71. — P. 386–398.

- Beilby M. J. Multi-scale characean experimental system: From electrophysiology of membrane transporters to cell-to-cell connectivity, cytoplasmic streaming and auxin metabolism // Front. Plant Sci. — 2016. — Vol. 7, No. 1052. — P. 1–20.
- Bellincampi D., Cervone F., Lionetti V. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions // Front. Plant Sci. — 2014. — Vol. 5, No. 228. — P. 1–8.
- Bernát G., Steinbach G., Kaňa R., Govinjee G., Misra A., Prašil O. On the origin of the slow M–T chlorophyll a fluorescence decline in cyanobacteria: interplay of short-term lightresponses // Photosynth. Res. — 2018. — Vol. 136. — P. 183–198.
- Bräutigam A., Weber A. P. M. Do metabolite transport processes limit photosynthesis? // Plant Physiol. 2011. Vol. 155. P. 43–48.
- Brunkard J. O., Zambryski P. C. Plasmodesmata enable multicellularity: new insights into their evolution, biogenesis, and functions in development and immunity // Curr. Opin. Plant Biol. — 2017. — Vol. 35. — P. 76–83.
- Bulychev A. A. Cyclosis-mediated intercellular transmission of photosynthetic metabolites in *Chara* revealed with chlorophyll microfluorometry // Protoplasma. 2019. Vol. 256 P. 815–826.
- Bulychev A. A. Transient depletion of transported metabolites in the streaming cytoplasm of *Chara* upon shading the long-distance transmission pathway // Biochim. Biophys. Acta. — Bioenerg. — 2020. — Vol. 1861, No. 148257.
- Bulychev A. A., Alova A. V., Bibikova T. N. Strong alkalinization of *Chara* cell surface in the area of cell wall incision as an early event in mechanoperception // Biochim. Biophys. Acta. – Biomembr. — 2013. — Vol. 1828. — P. 2359–2369.
- Bulychev A. A., Alova A. V., Krupenina N. A., Rubin A. B. Cytoplasmic streaming as an intracellular conveyer: Effect on photosynthesis and H⁺ fluxes in *Chara* cells // Biophysics. 2020. Vol. 65. P. 250–258.
- Bulychev A. A., Cherkashin A. A., Rubin A. B., Vredenberg W. J., Zykov V. S., Müller S. C. Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of *Chara corallina* // Bioelectrochemistry. — 2001a. — Vol. 53. — P. 225–232.
- Bulychev A. A., Foissner I. Pathways for external alkalinization in intact and in microwounded *Chara* cells are differentially sensitive to wortmannin // Plant Signal. Behav. — 2017. — Vol. 12, No. e1362518.
- Bulychev A. A., Foissner I. Inhibition of endosomal trafficking by brefeldin A interferes with long-distance interaction between chloroplasts and plasma membrane transporters // Physiol. Plant. — 2020. — Vol. 169. — P. 122–134.
- Bulychev A. A., Komarova A. V. Photoinduction of cyclosis-mediated interactions between distant chloroplasts // Biochim. Biophys. Acta — Bioenerg. — 2015. — Vol. 1847, No. 4–5. — P. 379–389.
- Bulychev A. A., Komarova A. V. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in *Chara* and its relation to pH bands // Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg. — 2017a. — Vol. 1858, No. 5. — P. 386–395.

- Bulychev A. A., Komarova A. V. Implication of long-distance cytoplasmic transport into dynamics of local pH on the surface of microinjured *Chara* cells // Protoplasma. — 2017b. — Vol. 254, No. 1. — P. 557–567.
- Bulychev A. A., Krupenina N. A. Interchloroplast communications in *Chara* are suppressed under the alkaline bands and are relieved after the plasma membrane excitation // Bioelectrochemistry. — 2019. — Vol. 129. — P. 62–69.
- Bulychev A. A., Polezhaev A. A., Zykov S. V., Plyusnina T. Yu., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B., Jantoß W., Zykov V. S., Müller S. C. Light-triggered pH banding profile in *Chara* cells revealed with a scanning pH microprobe and its relation to self-organization phenomena // J. Theor. Biol. — 2001b. — Vol. 212, No. 3. — P. 275–294.
- Foissner I., Wasteneys G. O. The characean internodal cell as a model system for studying wound healing // J. Microsc. 2012. Vol. 247. P. 10–22.
- Gerlitz N., Gerum R., Sauer N., Stadler R. Photoinducible DRONPA-s: a new tool for investigating cell-cell connectivity // Plant J. — 2018. — Vol. 94. — P. 751–766.
- Hardham A. R., Jones D. A., Takemoto D. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance // Curr. Opin. Plant. Biol. 2007. Vol. 10. P. 342–348.
- Jensen K. H. Phloem physics: mechanisms, constraints, and perspectives // Curr. Opin. Plant Biol. 2018. Vol. 43. P. 96–100.
- Komarova A. V., Sukhov V. S., Bulychev A. A. Cyclosis-mediated long distance communications of chloroplasts in giant cells of Characeae // Funct. Plant Biol. — 2018. — Vol. 45. — P. 236–246.
- Lim S. L., Voon C. P., Guan X., Yang Y., Gardeström P., Lim B. L. In planta study of photosynthesis and photorespiration using NADPH and NADH/NAD⁺ fluorescent protein sensors // Nat. Commun. — 2020. — Vol. 11, No. 3238.
- Nishiyama T. et al. The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization // Cell. 2018. Vol. 174, No. 2. P. 448–464.
- Mishra K. B., Mishra A., Kubásek J., Urban O., Heyer A. G., Govindjee G. Low temperature induced modulation of photosynthetic induction in non-acclimated and cold-acclimated *Arabidopsis thaliana*: chlorophyll a fluorescence and gas-exchange measurements // Photosynth. Res. — 2019. — Vol. 139. — P. 123–143.
- Park K., Knoblauch J., Oparka K., Jensen K. H. Controlling intercellular flow through mechanosensitive plasmodesmata nanopores // Nat. Commun. — 2019. — Vol. 10, No. 3564.
- Pertl-Obermeyer H., Lackner P., Schulze W. X., Hoepflinger M. C., Hoeftberger M., Foissner I., Obermeyer G. Dissecting the subcellular membrane proteome reveals enrichment of H⁺ (co-) transporters and vesicle trafficking proteins in acidic zones of *Chara* internodal cells // PLoS One. — 2018. — Vol. 13, No. 8. — P. e0201480.
- Sakmann B., Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes // Annu. Rev. Physiol. — 1984. — Vol. 46. — P. 455–472.
- Skobeleva O., Ktitorova I. N., Lyalin O. O. Cell burst as a mechanism of plant cell injury // Russ. J. Plant Physiol. — 1996. — Vol. 43. — P. 439–447.

- Stirbet A., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B., Govindjee G. Modeling chlorophyll a fluorescence transient: relation to photosynthesis // Biochemistry (Moscow). 2014. Vol. 79. P. 291–323.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling // Curr. Opin. Plant Biol. — 2011. — Vol. 14. — P. 691–699.
- Tian Y., Schreiber R., Kunzelmann K. Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels // J. Cell Sci. 2012. Vol. 125, No. 21. P. 4991–4998.

Characean algae as a model system for studying intercellular contacts, protection barriers, and cell transporters

A. A. Bulychev, A. V. Alova

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia E-mail: bulychev@biophys.msu.ru, annaalova@gmail.com

The successful use of plant cells for biotechnological purposes should rely on clear understanding of how the cell performs its basic functions. This chapter discusses the methods and prospects for studying fundamental plant cell processes, such as cell-to-cell transport of photometabolites through specialized narrow pores in cell walls, early physicochemical events induced by pointed mechanical wounding of cell wall, and the influence of intracellular hydrodynamic interactions on the induction changes of chlorophyll fluorescence. Owing to multiple unique properties, characean algae are particularly useful for studying the above cell processes in vivo. They represent a convenient model system for analyzing the permeability of plasmodesmata, the cell wall recovery after mechanical microinjury, and the role of cytoplasmic streaming in wound healing and regulation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence under uneven or fluctuating light. Cloning of characean genes opens up new possibilities for studying the molecular structure and functional properties of membrane transporters.

Keywords: Characean algae, long-distance transport, cytoplasmic streaming, plasmodesmata, cell wall, microwounding, induction of chlorophyll fluorescence, light-dependent transporters, chloroplast envelope membranes, ion channels.

Оксигенный фотосинтез: математическое моделирование регуляции электронного и протонного транспорта в хлоропластах

*А. В. Вершубский, А. Н. Тихонов*¹

Фотосинтез является одним из наиболее важных биологических процессов в биосфере, который обеспечивает производство органических веществ из атмосферного СО2 за счет солнечной энергии. В этой главе рассмотрены основные механизмы регуляции электронного транспорта в фотосинтетических системах оксигенного типа. В качестве конкретного примера компьютерного моделирования фотосинтетических процессов описывается кинетическая модель, которая включает ключевые стадии электронного транспорта, альтернативные пути переноса электронов вокруг фотосистемы 1 (ФС1), трансмембранный перенос протонов и синтеза АТР в хлоропластах. Модель учитывает такие процессы регуляции, как рН-зависимая регуляция переноса электронов между фотосистемами и активности фотосистемы 2 (ФС2) (нефотохимическое тушение), светозависимая активация цикла Кальвина-Бенсона. Численные эксперименты по моделированию этих процессов в условиях псевдоциклического электронного транспорта (цикл «вода-вода») показали хорошее согласие с экспериментальными данными по кинетике переноса электронов к фотосистеме 1 (ФС1) в хлоропластах класса Б в метаболических состояниях, соответствующих высокой (состояние 3) и низкой (состояние 4) активности АТР-синтазы. Моделирование электрон-транспортных процессов с учетом работы цикла Кальвина-Бенсона (ЦКБ), циклического транспорта электронов вокруг ФС1 и pH-зависимой диссипации энергии в фотосистеме 2 (ФС2) — нефотохимическое тушение (HФT) — позволило оценить вклад этих факторов в кинетику индукционных явлений в хлоропластах in situ. Сравнение расчетных и экспериментальных данных по кинетике окисления фотореакционного центра Р₇₀₀ показало, что учет тиоредоксинзависимой активации ЦКБ и АТР-синтазы позволяет наиболее точно описать многофазную кинетику индукции Р⁺₇₀₀. В рамках нашей модели мы смогли адекватно описать ряд экспериментальных температурных зависимостей фотосинтетических реакций в тилакоидах. Компьютерное моделирование электронного и протонного транспорта в сочетании с синтезом ATP подтверждает представление о том, что окисление PQH₂ комплексом Cyt $b_6 f$ и закачка протонов в люмен являются основными температурнозависимыми процессами, определяющими общий поток электронов от ФС2 к молекулярному кислороду и синтез АТР. Модель описывает две ветви температурной зависимости окисленной формы Р₇₀₀, характеризующиеся различными энергиями активации (около 60 и ≤ 3,5 кДж моль⁻¹).

Ключевые слова: фотосинтез, хлоропласты, электронный и протонный транспорт, математическое моделирование.

¹ Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, ГСП-2, Москва 119992, Россия. E-mail: an_tikhonov@mail.ru

1. Введение

Хлоропласты (от греч. χλωρός — зеленый и πλαστός — вылепленный) зеленые пластиды, содержащие хлорофилл, в них происходит фотосинтез. Хлоропласты высших растений обладают легко проницаемой наружной мембраной и менее проницаемой внутренней, в которую встроены специальные транспортные белки. Между внешними мембранами имеется узкое пространство. Эти мембраны образуют оболочку, отделяющую его внутреннее пространство хлоропласта от цитоплазмы растительной клетки. Внутреннее пространство хлоропласта представляет собой относительно однородную среду (строму), которую пронизывают вытянутые мембраны — ламеллы, образующие замкнутые пузырьки — тилакоиды. Стопки плотно прилегающих друг к другу тилакоидов образуют граны. Граны объединены друг с другом с помощью межгранных тилакоидов. В мембраны тилакоидов встроены пигмент-белковые комплексы фотосистемы 1 (ФС1) и фотосистемы 2 (ФС2), обеспечивающие протекание первичных (световых) стадий фотосинтеза. На тилакоидной мембране, отделяющей внутритилакоидное пространство (люмен) от стромы, создается разность электрохимических потенциалов ионов водорода, которая служит источником энергии для работы АТР-синтазных комплексов, катализирующих образование АТР. Ферменты «темновой» стадии фотосинтеза, которые катализируют реакции восстановительного цикла углерода (цикл Кальвина-Бенсона), находятся в строме [Эдвардс, Уокер, 1986].

В фотосинтетических системах оксигенного типа энергия квантов света, поглощаемых светособирающими антеннами ФС1 и ФС2, обеспечивает поток электронов от молекул воды, расщепляемых в ФС2, к NADP⁺ — терминальному двухэлектронному акцептору ФС1 [Blankenship, 2002; Nelson, Yocum, 2006]. Цепь переноса электронов между фотосистемами ФС2 и ФС1 (электрон-транспортная цепь, ЭТЦ) включает в себя пул молекул пластохинона (PQ), цитохромный комплекс (Cyt $b_6 f$) и молекулы пластоцианина (Pc). ФС2 восстанавливает РQ до PQH₂ (пластохинол — полностью восстановленная форма пластохинона); при этом два протона поступают к пластохинону из стромы. PQH₂ отдает два электрона комплексу Cyt $b_6 f$, а два протона высвобождаются во внутритилакоидное пространство, называемое люменом (PQH₂ \rightarrow PQ + 2e⁻ + 2H⁺_{in}). Цитохромный комплекс Cyt $b_6 f$ восстанавливает Pc, который передает электрон окисленному первичному донору электронов в $\Phi C1 (P_{700}^+)$, а окисленная молекула PO участвует в следующем витке переноса электронов от $\Phi C2$ к Cyt $b_6 f$. Таким образом, перемещаясь в тилакоидной мембране между двумя фотосистемами, РОН₂ действует как носитель электронов и протонов, который перекачивает два иона H^+ из стромы внутрь тилакоида. Окисление PQH_2 цитохромным комплексом Cyt *b*₆*f* — лимитирующая стадия («бутылочное горлышко») в цепи переноса электронов между фотосистемами. Относительная емкость пула молекул PQ заметно превышает емкость белковых электрон-транспортных комплексов, около 5–12 молекул PQ на ЭТЦ [Witt, 1979]. Избыток молекул PQ по отношению к другим компонентам ЭТЦ может влиять на транспорт электронов между фотосистемами: увеличение размера пула PQ коррелирует с усилением потока электронов от ФС2 в ЭТЦ [Suslichenko, Tikhonov, 2019].

Пигментно-белковые комплексы Φ C1 и Φ C2, а также ATP-синтазные комплексы распределены неравномерно между гранальными и стромальными тилакоидами. Плотно упакованные тилакоиды гран обогащены комплексами Φ C2, в то время как большинство Φ C1 и ATP-синтазных комплексов локализованы в экспонированных в строму тилакоидах и краях мембран граны. Таким образом, многие комплексы Φ C2 и Φ C1 оказываются удаленными друг от друга. В отличие от Φ C1 и Φ C2, цитохромные b_6f -комплексы распределены почти равномерно вдоль гранальных и стромальных ламелей. Около 50 % цитохромных b_6f -комплексов локализованы в тесно прижатых друг к другу мембранах гран [Albertsson, 2001]. Остальные b_6f -комплексы распределены по мембранам межгранных стромальных тилакоидов, на краях и торцах гранальных мембран.

В природе растения растут в изменчивых условиях окружающей среды, когда интенсивность и спектральный состав света изменяются в широких пределах. У растений выработались «краткосрочные» и «долгосрочные» механизмы регуляции электронного транспорта, способствующие высокой эффективности фотосинтеза, минимизирующие вредное воздействие избыточного света на фотосинтетический аппарат и обеспечивающие устойчивое развитие растений [Kono, Terashima, 2014]. Кратковременные (секунды-минуты) регуляторные процессы обычно происходят без изменения состава фотосинтетического аппарата. Эти механизмы включают в себя: (1) pH-зависимую регуляцию скорости электронного потока между ФС2 и ФС1 [Trubitsin et al., 2015; Tikhonov, 2013] и активности ФС2, связанную с нефотохимическим тушением (НФТ) возбужденных молекул Chl в ФС2 [Li et al., 2009]; (2) активацию/деактивацию реакций цикла Кальвина-Бенсона (ЦКБ) [Balsera et al., 2016]; (3) перераспределение световой энергии между ФС1 и ФС2 вследствие изменения размеров их фотосинтетических антенн [Minagawa, 2011]; (4) структурные изменения в архитектуре хлоропластов [Kirchhoff et al., 2011] и (5) индуцированное светом/темнотой перемещение хлоропластов внутри растительной клетки [Banaś et al., 2012]. Долговременная (часы-дни) регуляция фотосинтеза связана со структурными перестройками хлоропластов и изменениями пигментного состава светособирающих антенн и стехиометрии белковых комплексов [Wada et al., 2003].

Математическое моделирование фотосинтеза — один из эффективных инструментов исследования процессов фотосинтеза, позволяющий анализировать

взаимосвязь различных регуляторных механизмов, обеспечивающих оптимальное функционирование фотосинтетического аппарата. Математическому моделированию процессов фотосинтеза посвящено большое количество работ, которые охватывают такие важнейшие стадии фотосинтеза, как поглощение квантов света, миграция энергии, разделение зарядов в фотореакционных центрах и электронный перенос, реакции цикла Кальвина (см. библиографию в [Рубин, Шинкарев, 1984; Кукушкин, Тихонов, 1988; Laisk et al., 2009; Rubin, Riznichenko, 2014]). Отличительной особенностью математических моделей, разработанных нами [Вершубский и др., 2014; Vershubskii et al., 2011, 2017; Tikhonov, Vershubskii, 2014], является то, что в них рассмотрены процессы трансмембранного переноса протонов с учетом буферных свойств тилакоидной мембраны и описаны диффузионно-контролируемые стадии переноса электронов с учетом латеральной гетерогенности ламеллярной системы хлоропластов [Вершубский и др., 2001, 2004]. В настоящей главе мы рассмотрим моделирование регуляции электронного и протонного транспорта в хлоропластах, сопряженных с синтезом АТР. В качестве иллюстрации возможностей компьютерного моделирования регуляции световых стадий фотосинтеза рассмотрены процессы регуляции фотосинтетического транспорта электронов, связанные с фотоиндуцированными изменениями рН люмена и стромы, а также тиоредоксин-зависимая регуляция цикла Кальвина-Бенсона и АТР-синтазы, которые обеспечивают оптимальную работу фотосинтетического аппарата растений.

2. Описание модели

В основе модели электронного и протонного транспорта в хлоропластах, описываемой в настоящей главе, лежит базовая модель фотосинтеза оксигенного типа, предложенная нами в работах [Вершубский и др., 2014, 2018]. Схема рассматриваемых процессов показана на рис. 1. В модели учитываются альтернативные пути переноса электронов в хлоропластах: (1) нециклический перенос электронов от Φ C2 к Φ C1 и далее к NADP⁺; (2) псевдоциклический транспорт электронов с участием молекулярного кислорода в качестве акцептора электрона в Φ C1, и (3) циклический перенос вокруг Φ C1. Возможность переноса электронов по альтернативным путям позволяет осуществлять тонкую «настройку» фотосинтетического аппарата, обеспечивая оптимальную стехиометрию молекул NADPH и ATP, используемых в ЦКБ. Наряду с этим рассматриваются сопряженные с ними процессы трансмембранного переноса протонов и синтез ATP из ADP и неорганического фосфата (P_i).

Электронный транспорт. Поток электронов от $\Phi C1$ к NADP⁺ (J_{NADP}) приводит к образованию NADPH за счет электронов, поступающих в цепь электронного транспорта от $\Phi C2$ (нециклический транспорт электронов: $H_2O \rightarrow$



Рис. 1. Процессы электронного и протонного транспорта, рассматриваемые в модели, и схема компартментализации ионов водорода и трансмембранных потоков протонов, описываемых в модели. Обозначения: ЦКБ — цикл Кальвина–Бенсона; Fd — ферредоксин; FNR — ферредоксин-NADP-редуктаза; FQR — ферредоксин-хинон редуктаза; NDH-1 — НАД(Ф)Н-оксидо-редуктаза; P₇₀₀ и P₆₈₀ — первичные доноры электрона фотосистемы 1 (ФС1) и фотосистемы 2 (ФС2), соответственно; Pc — пластоцианин; c_6 — цитохром c_6 ; PQ — пластохинон (окисленная форма); PQH₂ — пластохинол (восстановленная форма); b_6f — цитохромный комплекс b_6f ; aa_3 , bd — терминальные оксидазы типа aa_3 и bd

→ Φ C2 → Φ C1 → NADP⁺). Акцептором электрона в Φ C1 является ферредоксин (Fd). Два электрона от двух восстановленных молекул ферредоксина (Fd⁻) поступают к NADP⁺ через ферредоксин-NADP-редуктазу (FNR). Циклический поток электронов вокруг Φ C1 (J_{SC}), при котором электроны возвращаются в ЦЭТ между Φ C2 и Φ C1 через фередоксин-хинон-редуктазу (FQR), будем называть «коротким» циклом. Возможен также «длинный» путь циклического переноса электронов вокруг Φ C1 (J_{LC}), когда электроны от NADPH возвращаются
на пластохиноновый участок цепи между Φ C2 и Φ C1 через NAD(P)-оксидо-редуктазу (NDH). Третий путь оттока электронов от Φ C1 — перенос электрона от Φ C1 на молекулу O₂ (реакция Мелера). Также описывается участие терминальных оксидаз *bd* и *aa*₃, катализирующих окисление пластохинола (PQH₂) и пластоцианина (Pc) за счет переноса электронов на молекулярный кислород. Однако относительный вклад этих процессов в окисление PQH₂ и Pc невелик, потому при описании процессов фотоиндуцированного транспорта электронов мы пренебрегаем этими процессами.

Восстанавливаемые за счет Φ C1 молекулы NADP⁺ протонируются ионами водорода, поступающими из стромы (NADP⁺ + 2e⁻ + H⁺ \rightarrow NADPH). В модели предусмотрено, что фотоиндуцированное защелачивание стромы ускоряет потребление NADPH и ATP в реакциях ЦКБ. Потребление NADPH и ATP описывается феноменологически с помощью функции, зависящей от концентраций NADPH, ATP и pH стромы (pH_o), как это было предложено в работах [Вершубский и др., 2001, 2004; Vershubskii et al., 2011]. Мы также учитываем, что Φ C1 может быть донором электронов для молекулярного кислорода (реакция Мелера).

Протонный транспорт. Транспорт электронов по ЭТЦ тесно сопряжен с генерацией трансмембранной разности рН (ДрН). Накопление протонов внутри тилакоидов происходит в результате индуцированного светом разложения воды в ФС2 и окисления пластохинола (PQH₂) цитохромным b₆f-комплексом. Трансмембранный градиент протонов играет важную энергетическую роль (источник энергии для синтеза АТР), он также выполняет регуляторную и сигнальную функции [Тихонов, 2012]. Изменения рН в строме и люмене хлоропласта оказывают заметное влияние на кинетику переноса электронов по фотосинтетической ЭТЦ, нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, обратимую редокс-трансформацию ксантофиллов (так называемый виолаксантиновый цикл), функциональное состояние АТР-синтазы, активность ферментов темновой фазы фотосинтеза. В модели учитывается, что ионы водорода, локализованные внутри (люмен) и снаружи (строма) тилакоидов, могут связываться с протон-акцепторными (буферными) группами, число которых значительно превышает число электронных переносчиков. Влияние буферных групп заметно сказывается на кинетике достижения стационарного состояния системы, однако стационарные значения переменных модели не должны зависеть от буферной емкости хлоропластов.

Выход протонов из тилакоидов в строму может происходить двумя путями: через АТР-синтазу (сопряженный с синтезом АТР поток протонов J_{ATP}) и путем пассивной утечки протонов, не связанной с синтезом АТР (поток протонов J_{pass}). В модели также учитывается обмен протонами между стромой и цитозолем (поток протонов J_{cell}). Для моделирования процессов переноса протонов через тилакоидную мембрану мы использовали функции, описывающие «активный» (сопряженный с синтезом ATP, J_{ATP}) и «пассивный» (утечка протонов через мембрану, J_{pass}) потоки протонов, которые зависят от разности концентраций ионов водорода [H_i^+] и [H_o^+]. «Активный» поток протонов J_{ATP} зависит также от соотношения концентраций ADP и ATP — субстрата и продукта реакции, катализируемой ATP-синтазой. Обоснование того, как выбирается функция, описывающая трансмембранный перенос протонов через ATP-синтазу, а также описание функций и констант, определяющих потоки J_{cell} и J_{pass} , можно найти в работе [Tikhonov, Vershubskii, 2014].

Описывается поведение следующих переменных: [Р₇₀₀] — концентрация окисленных центров P₇₀₀ (первичный донор электронов в ФС1), [P⁺₆₈₀] — концентрация окисленных центров Р₆₈₀ (первичный донор электронов в ФС2), [Рс] — концентрация окисленных переносчиков, являющихся непосредственными донорами электронов для окисленных центров P_{700}^+ (пластоцианин в хлоропластах и/или цитохром c₆ у цианобактерий), [PQ] — концентрация окисленного пластохинона, [Fd] — концентрация окисленного ферредоксина, [N⁺] и [NH] — концентрации терминального акцептора ФС1 в окисленной и восстановленной формах соответственно — NADP⁺ и NADPH. Переменная [ATP] описывает изменения концентрации ATP. Переменные [H_{in}⁺] и [H_{out}⁺] описывают изменения концентраций ионов водорода во внутритилакоидном пространстве и строме, соответственно. При моделировании считается, что все переносчики электронов распределены однородно в мембране тилакоида и скорость переноса электронов не лимитируется диффузией мобильных переносчиков электрона (см. обоснование в [Vershubskii et al., 2011]). Система обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих поведение переменных модели во времени, подробно описана в нашей недавней работе [Вершубский и др., 2018].

3. pH-зависимая регуляция электронного транспорта в хлоропластах

Среди процессов регуляции фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах особый интерес представляют механизмы, связанные с фотоиндуцированными изменениями pH люмена (pH_{in}) и стромы (pH_{out}) [Вершубский, Тихонов, 2019]. Изменение pH_{in} — один из главных факторов, контролирующих поток электронов между Φ C2 и Φ C1. Фотоиндуцированное уменьшение pH_{in} вызывает замедление переноса электронов на участке ЭТЦ, связанном с работой *b*₆*f*-комплекса, и запускает механизм, увеличивающий рассеяние энергии света, поглощенного светособирающей антенной Φ C2. Эти процессы препятствуют возбуждению избыточного числа пигментов в Φ C2 и чрезмерному закислению люмена. Они обеспечивают стабильность работы фотосинтетического аппарата при изменениях условий окружающей среды, например, при варьировании интенсивности освещенности и газового состава атмосферы [Rochaix, 2011; Kono, Terashima, 2014].

Для иллюстрации роли рН_{іп} в регуляции фотосинтетического транспорта электронов рассмотрим процессы, связанные с изменениями метаболического состояния хлоропластов в условиях псевдоциклического транспорта электронов $(H_2O \rightarrow \Phi C2 \rightarrow QH_2 \rightarrow b_6f \rightarrow Pc \rightarrow \Phi C1 \rightarrow O_2)$ в хлоропластах класса Б. Эти хлоропласты лишены оболочки, в них отсутствуют ферменты ЦКБ, однако при этом сохраняется целостность (замкнутость) тилакоидов, благодаря чему они способны генерировать ДрН и синтезировать АТР. Рассмотрим функционирование хлоропластов в условиях активного синтеза АТР (метаболическое состояние 3) и в условиях фотосинтетического контроля, когда не происходит синтеза АТР (состояние 4). Основные закономерности явления фотосинтетического контроля, связанного с переходами между метаболическими состояниями 3 и 4, адекватно описываются в рамках нашей модели. На рис. 2 показаны результаты моделирования кинетики фотоиндуцированных окислительно-восстановительных превращений Р₇₀₀ (a) и РQ (б), а также изменений pH_{in} (в) в хлоропластах класса Б. Предполагается, что снаружи тилакоидов pH_{out} = 8,0 = const (за счет высокой буферной емкости среды инкубации хлоропластов). В согласии с экспериментальными данными [Tikhonov, Subczynski, 2005; Tikhonov, Vershubskii, 2014], освещение хлоропластов дальним красным светом (ДКС), возбуждающим преимущественно ФС1, индуцирует окисление P700. При этом также окисляется PQ. После включения белого света (БС), эффективно возбуждающего обе фотосистемы, происходит быстрое восстановление Р₇₀₀ за счет притока электронов по цепи электронного транспорта от ФС2 к ФС1. Ход кинетической кривой зависит от метаболического состояния хлоропластов. В отсутствие ADP, когда не происходит синтеза ATP (состояние 4), наблюдается незначительный спад концентрации Р⁺₇₀₀ (рис. 2, *a*), что отражает торможение переноса электронов вследствие снижения pH люмена до pH_{in} ≈ 5,8 при внешнем pH_{out} = 8 (рис. 2, в). В условиях синтеза АТР (состояние 3) протоны из люмена выходят во внешнее пространство через активно функционирующие АТРсинтазные комплексы. При этом pHin снижается слабее, чем в состоянии 4, а потому скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1 в состоянии 3 поддерживается высокой. Более интенсивный поток электронов между фотосистемами сопровождается заметным снижением [P₇₀₀] и некоторым увеличением [PQ].



Рис. 2. Расчетная кинетика фотоиндуцированных изменений относительных концентраций окисленных реакционных центров P_{700}^+ (*a*), окисленного пластохинона PQ (*б*) и фотоиндуцированных изменений внутритилакоидного pH_{in} (*s*) в зависимости от метаболического состояния хлоропласта класса Б. Номера кривых соответствуют метаболическому состоянию. Состояние 3 — активный синтез ATP (в исходном состоянии [ATP]₀/[P₇₀₀]₀ = 150); состояние 4 — фотосинтетический контроль (ATP-синтаза неактивна); состояние 5 — разобщенные хлоропласты ($\Delta pH = 0$). (См. подробнее в работе [Вершубский, Тихонов, 2019])

По мере истощения пула молекул ADP хлоропласты переходят в метаболическое состояние 4. При этом $[P_{700}^+]$ возрастает и в конечном итоге достигает уровня, характерного для состояния 4. В то же время концентрация окисленного пластохинона уменьшается из-за замедления скорости окисления PQH₂ в результате снижения pH_{in} (рис. 2, *в*). При моделировании разобщенных хлоропластов (состояние 5), когда pH_{in} = pH_{out} = const, скорость переноса электронов сохраняется высокой на протяжении всего времени действия БС, при этом заметно снижается [P_{700}⁺] и уменьшается концентрация восстановленного пластохинона.

О скорости переноса электронов между фотосистемами можно судить по кинетике восстановления P_{700}^+ после выключения света [Wada et al., 2003]. Если $\tau_{1/2}$ — время полувосстановления P_{700}^+ , то обратная величина $\tau_{1/2}^{-1}$ может служить параметром, характеризующим скорость переноса электронов к окисленным центрам P_{700}^+ . Рисунок 3 иллюстрирует сказанное. На панели 3, *а* показано, как происходит спад переменной $[P_{700}^+]$ после выключения белого света (БС). Скорость спада $[P_{700}^+]$ зависит от метаболического состояния хлоропластов: в состоянии 4 восстановление P_{700}^+ происходит медленнее, чем в условиях синтеза АТР (состояние 3) или в состоянии 5 («разобщенные» хлоропласты).



Рис. 3. Кинетика спада переменной $[P_{700}^+]$ после выключения белого света, действовавшего 20 с, рассчитанная для различных состояний хлоропласта класса Б (панель *a*). Номера кривых соответствуют метаболическому состоянию. На панели δ показаны зависимости скорости переноса электронов между ФС2 и ФС1 (параметр $\tau_{1/2}^{-1}$) от длительности действия белого света при различных метаболических состояниях хлоропласта класса Б. Кривые 3*a*, 3*b*, 3*e* относятся к состоянию 3 при различных значениях пула ATP: *a* — [ATP]₀/[P₇₀₀]₀ = 200; δ — [ATP]₀/[P₇₀₀]₀ = 150; *e* — [ATP]₀/[P₇₀₀]₀ = 100. (По материалам работы [Вершубский, Тихонов, 2019])

На рис. 3, б показано, как меняется значение параметра $\tau_{1/2}^{-1}$, характеризующего скорость восстановления P_{700}^+ , по мере действия белого света (БС). Зависимость $\tau_{1/2}^{-1}$ от длительности действия БС свидетельствует, что скорость

переноса электронов между ФС2 и ФС1 замедляется при переходе от метаболического состояния 3 в состояние «фотосинтетического контроля» (состояние 4). В отсутствие добавленного АТР торможение электронного транспорта наступает за время, равное ≈ 5 с, что обусловлено быстрым снижением pH_{in}. В состоянии 3 (при избытке ADP) скорость переноса электронов остается высокой в течение первых 20 с освещения, поскольку утечка протонов через комплекс CF₀-CF₁ предотвращает слишком сильное закисление люмена (pH_{in} ~ 6,2 при pH_{out} = 8,0). Создаваемая в состоянии 3 разность pH достаточна $(\Delta pH = 1,8)$, чтобы поддерживать интенсивный синтез ATP [Trubitsin et al., 2015]. При этом вследствие умеренного закисления люмена поток электронов между ФС2 и ФС1 сохраняется высоким. Со временем, по мере истощения АДФ и образования избытка АТР, приток электронов к P₇₀₀ замедляется вследствие дополнительного снижения pH_{in}, что отражает смену метаболических состояний (состояние 3 → состояние 4). Результаты расчетов для разных исходных концентраций АДФ хорошо согласуются с экспериментальными данными [Tikhonov, 2013]. Как видно из рис. 3, б, задержка, предшествующая торможению электронного транспорта (переход хлоропластов из состояния 3 в состояние 4), возрастает при увеличении исходной концентрации АДФ, добавленного к хлоропластам, в согласии с измерениями скорости переноса электронов между ФС2 и ФС1 в хлоропластах класса Б [Tikhonov, 2013]. В то же время в состояниях 4 ($\Delta pH = 2,2 = const$) и 5 ($\Delta pH = 0$) скорости электронного транспорта остаются постоянными.

4. Тиоредоксин-зависимая регуляция цикла Кальвина–Бенсона и АТР-синтазы

Продукты световой стадии фотосинтеза — АТР и NADPH — потребляются в основном в ЦКБ. Регуляция реакций ЦКБ обеспечивает оптимальный баланс образования NADPH и ATP в зависимости от условий освещения и метаболического состояния хлоропластов [Buchanan, 1991; Balsera et al., 2016]. Активация реакций ЦКБ при действии света включает в себя редокс-зависимые процессы, влияющие на активность ферментов за счет восстановления тиоловых групп, а также регуляторные явления, обусловленные конформационными изменениями ферментов, индуцированные присоединением метаболитов или энергизацией тилакоидной мембраны [Eberhard et al., 2008]. Редокс-зависимая активация ключевых ферментов представляет собой один из основных способов активации ЦКБ. К этим ферментам относятся фосфорибулозокиназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, фруктозо-1,6-бифосфатаза и седогептулозо-1,7-бифосфатаза. В темноте эти ферменты обладают низкой активностью, но они активируются при освещении. Активность ключевого фермента ЦКБ — рибулозодифосфаткарбоксилазы (РДФК, называемая в англоязычной литературе RUBISCO) — также возрастает при освещении за счет редокс-зависимой активации «вспомогательного» фермента — РДФК-активазы [Dietz, Pfannschmidt, 2011]. Активность РДФК-активазы зависит от отношения ATP/ADP и регулируется в зависимости от состояния Fd и тиоредоксина (Tr), белка, непосредственно влияющего на статус тиоловых групп ферментов-мишеней. В темновых условиях RUBISCO невыгодно оставаться в активной форме, так как этот фермент катализирует еще побочную реакцию с молекулярным кислородом — фотодыхание. Светозависимое восстановление тиоловых групп приводит к заметному увеличению активности РДФК [Michelet et al., 2013].

В хлоропластах имеются тиоредоксины (Tr) двух типов (f и m), которые играют центральную роль в редокс-регуляции фотосинтетических процессов. Основной формой тиоредоксина, активирующей ферменты ЦКБ и ATP-синтазу, является Tr f [Balmer et al., 2003]. Тиоредоксин восстанавливается тиоредоксин-редуктазой, донором электронов для которой служит восстановленный ферредоксин. Тиоредоксин — небольшой (12–14 кДа) регуляторный белок с двумя остатками цистеина в активном центре, которые могут окисляться с образованием дисульфидной связи. Тиоредоксин восстанавливается тиоредоксин-редуктазой (TrR), которая, в свою очередь, восстанавливается ферредоксином (Fd \rightarrow \rightarrow TrR \rightarrow Tr). Восстановленный тиоредоксин (TrH₂) отдает электроны белкаммишеням, восстанавливая их тиоловые группы. При освещении хлоропластов ферменты ЦКБ активируются, обеспечивая тем самым быстрое потребление ATP и NADPH и ускоряя отток электронов от Φ C1. TrH₂ может также активировать ATP-синтазу, восстанавливая -S-S-мостики γ -субъединицы ATP-синтазной сименталь самылеста [Mills, Mitchell, 1984].

При моделировании роли тиоредоксина в регуляции электронного транспорта на акцепторном участке предполагается, что в начальный момент времени моделируемая система находится в «энергосберегающем» режиме: ферменты ЦКБ и АТФ-синтаза неактивны; исходные концентрации NADPH и TrH₂ близки к нулю. В начале индукционной фазы, когда ферменты ЦКБ еще неактивны, пулы Fd и NADP быстро восстанавливаются. При этом усиливается поток электронов от Fd⁻ к тиоредоксину, что способствует активации ЦКБ и АТРсинтазы, что может проявиться в кинетике фотоокисления P₇₀₀. При расчетах кинетических кривых варьируемым параметром модели была безразмерная величина μ , которая отражает степень влияния тиоредоксина на процессы активации ЦКБ и АТР-синтазы [Вершубский и др., 2018].

На рис. 4 приведены расчетные кривые, показывающие, что активация ЦКБ и АТР-синтазы может влиять на кинетику фотоиндуцированных изменений концентрации Р⁺₇₀₀. Представленные на этом рисунке теоретические кривые



Рис. 4. Расчетная кинетика фотоиндуцированных изменений относительных концентраций окисленных реакционных центров P_{700}^+ в хлоропластах при варьировании параметра μ . Безразмерный параметр модели μ характеризует взаимодействие восстановленного тиоредоксина с АТР-синтазой и ферментами ЦКБ. Для сравнения с расчетными данными приведена кинетическая кривая фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от P_{700}^+ для листьев традесканции (*Tradescantia fluminensis*), которая представляет собой модифицированный фрагмент рис. 8 из работы [Mishanin et al., 2016]. (Теоретические кривые приведены по материалам работы [Вершубский, Тихонов, 2019])

были получены при разных значениях параметров модели μ . Безразмерный параметр модели μ характеризует взаимодействие восстановленного тиоредоксина с АТР-синтазой и ферментами ЦКБ. На этом же рисунке приведена типичная экспериментальная кривая фотоокисления P₇₀₀, полученная ранее методом ЭПР для листьев традесканции (*Tradescantia fluminensis*) [Mishanin et al., 2016]. Видно, что сразу после включения света происходит сравнительно быстрый рост [P₇₀₀] (стадия *O*–*A*), за которым следует спад [P₇₀₀⁺] до промежуточного уровня *B*. Такого рода немонотонный переходный процесс (*O*–*A*–*B*), характерный для первых стадий индукции P₇₀₀⁺, наблюдается в экспериментах по измерению кинетики окисления P₇₀₀ в листьях высших растений оптическим методом (см., например, подробный анализ этого явления в работе [Булычев, Вреденберг, 2010]). Как было показано нами ранее [Вершубский и др., 2018], высота пика *O*–*A* зависит от начальных условий: в случае исходно окисленного пула. Глубина спада A-B зависит от стехиометрии Φ C2 и Φ C1 (данные не приведены), а также от значений варьируемых параметров μ . На рис. 4 в качестве примера приведены кинетические кривые для концентрации $[P_{700}^+]$, рассчитанные при разных значениях μ . Усиление редокс-зависимой активации ЦКБ, характеризуемое увеличением параметра μ , способствует росту концентрации P_{700}^+ на начальной стадии индукции процесса. При увеличении скорости взаимодействия восстановленного тиоредоксина с АТР-синтазой и ферментами ЦКБ (увеличение безразмерного параметра модели μ), лаг-фаза, предшествующая росту $[P_{700}^+]$, существенно сокращается, а фаза замедленного роста $[P_{700}^+]$ (стадия *C–D*) сдвигается влево, что свидетельствует о заметном ускорении окисления P_{700} . Таким образом, результаты наших расчетов показали, что тиоредоксин-зависимая активация ферментов ЦКБ может оказывать заметное влияние на кинетику фотоокисления P_{700} , поскольку эти процессы существенно влияют на увеличение потока потоков электронов на акцепторной стороне Φ C1.

Редокс-зависимая регуляция ключевых процессов фотосинтеза, таких как синтез АТР и функционирование ЦКБ, может проявиться в кинетике фотоокисления Р₇₀₀. Как видно из рис. 4, где мы сравнили кинетические кривые, рассчитанные для различных значений параметра модели μ , по мере увеличения μ возрастает относительный вклад фазы В и сокращается ее длительность. Низкий уровень сигнала от Р⁺₇₀₀, регистрируемого разными методами (ЭПР-спектроскопия, оптические методы регистрации), на начальной стадии индукции обычно связывают с замедленным функционированием ЦКБ и возрастанием вклада циклического потока электронов, по которому электроны возвращаются с акцепторного участка ФС1 к Р⁺₇₀₀ [Вершубский и др., 2014]. С учетом редоксзависимой активации ЦКБ ($\mu = 7-10$) мы получили реалистичное описание многофазной кинетики фотоокисления Р₇₀₀ в листьях высших растений (ср. теоретические кривые с экспериментальной зависимостью, показанной на рис. 4).

5. Температурно-зависимая регуляция световых стадий фотосинтеза в хлоропластах

Фотосинтетический аппарат чувствителен к изменениям внешней среды растений, в том числе к колебаниям температуры. Значение температурно-зависимой регуляции фотосинтетического аппарата определяется тем, что растения являются пойкилотермическими организмами (их собственная температура изменяется в зависимости от температуры окружающей среды). Важную роль в адаптации хлоропластов к изменениям температуры играют тилакоидные липиды. Галактолипиды моногалактозилдиацилглицерин (MGDG) и дигалактозилдиацилглицерин (DGDG) — основные липиды тилакоидных мембран участвуют в терморегуляции фотосинтеза. Обогащенность мембранных липидов ненасыщенными жирными кислотами приводит к сдвигу температуры структурного перехода («текучесть») тилакоидных мембран в области более низких температур. Большое содержание ненасыщенных жирных кислот определяет высокую «текучесть» внутренних мембран тилакоидов и способствует ускорению диффузии подвижных электронных переносчиков. Вместе с тем, ненасыщенные жирные кислоты подвержены перекисному окислению, что в условиях образования активных форм кислорода в хлоропластах становится чрезвычайным фактором риска повреждения мембран [Вершубский, Тихонов, 2021]. Адаптация фотосинтетического аппарата к низким (или высоким) температурам может происходить за счет увеличения (или уменьшения) степени десатурации жирных кислот в галактолипидах [Zhou et al., 2016]. В литературе можно найти разнообразную информацию о температурной зависимости различных реакций в хлоропластах, таких как перенос электронов и транслокация протонов [Nolan, 1981; Schuurmans, Kraayenhof, 1983], и о структурных переходах в тилакоидных мембранах, обнаруженных флуоресцентными и/или парамагнитными зондами [Ford et al., 1982; Tikhonov, Subczynski, 2005].

Термоиндуцированные структурные изменения в тилакоидных мембранах относятся к основным факторам, определяющим реакцию хлоропластов на изменения температуры [Hu et al., 2020]. Один из механизмов поддержания достаточно высокой активности фотосинтетического аппарата при колебаниях температуры связан с реорганизацией мембранных структур, включая изменения физического состояния тилакоидной мембраны [Niu, Xiang, 2018]. Перестройка фотосинтетических липидно-белковых структур может влиять на скорость процессов переноса электронов и протонов, связанных с синтезом АТР, обеспечивая тем самым оптимальную адаптацию фотосинтетического аппарата к температуре окружающей среды. Микровязкость («текучесть») мембранных липидов играет важную роль в регуляции фотосинтетических процессов. Имеются веские основания полагать, что акклиматизация растений к температуре окружающей среды реализуется изменением состава мембранных липидов (насыщенных/ненасыщенных липидов), определяющих локальную вязкость липидных доменов [Tietz et al., 2015]. Изменения относительного содержания ненасыщенных жирных кислот проявляются в температурных зависимостях физических параметров биологических мембран (см. ссылки в [Lutova, Tikhonov, 1988]). Липиды с ненасыщенными жирными кислотами имеют более низкую температуру «плавления», чем липиды, содержащие насыщенные жирные кислоты; соотношение между этими липидами является одним из ключевых факторов, определяющих «текучесть» мембран и диффузию липидов в тилакоидных мембранах [Tietz et al., 2015]. Снижение «текучести» липидных областей тилакоидных мембран, вызванное, например, появлением холестерина, сопровождается ингибированием нециклического переноса электронов [Barber et al., 1984]. Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот зависит от условий роста растений [Sawada, Miyachi, 1974]. Физическое состояние мембранных липидов часто рассматривается как своеобразный сенсор, который запускает ретроградные сигналы, контролирующие экспрессию десатураз, приспосабливая таким образом тилакоидную мембрану к температуре окружающей среды и тем самым оптимизируя передачу энергии в фотосинтетических организмах [Los et al., 2013].

Вариации температуры влияют на фотохимическую активность Φ C2, скорость переноса электрона от PQH₂ к P⁺₇₀₀ (через комплекс Cyt $b_6 f$ и Pc), а также растворимость O₂ в водных растворах. Мы проанализировали процессы переноса электронов в диапазоне температур от 0 до 45 °C, поскольку известно, что активность Φ C2 полностью ингибируется при температурах \geq 45 °C (см., например, [Benkov et al., 2019]). Параметризация температурных зависимостей при исследовании парциальных реакций переноса электронов основана на экспериментальных данных, заимствованных из наших предыдущих работ по хлоропластам бобов класса Б.

В контексте проблемы структурно-функциональных взаимосвязей, наблюдаемых при сравнении функциональных (перенос электронов, транслокация протонов, синтез ATP) и структурных характеристик тилакоидных мембран, было интересно рассмотреть модели, различающиеся по температурно-зависимым закономерностям парциальных фотосинтетических реакций. Рассмотрены модели, характеризующиеся различными значениями параметра t_0 , связанными с точками перегиба температурных зависимостей парциальных фотосинтетических реакций, которые, как предполагается, отражают температуру структурных переходов в липидных доменах тилакоидных мембран. Для выбора этих зависимостей мы использовали экспериментальные данные по изучению парциальных температурных зависимостей фотосинтетических процессов в хлоропластах класса Б, выделенных из листьев фасоли [Tikhonov, Vershubskii, 2020].

Влияние температуры на редокс-превращения Р₇₀₀

Механизм влияния вариации температуры на кинетику переноса электронов между фотосистемами может быть реализован несколькими способами. Один из механизмов представляет собой общее влияние температурных колебаний на активность парциальных химических реакций, которое может быть аппроксимировано законом Аррениуса. Другой механизм может быть связан с температурно-зависимыми структурными изменениями в тилакоидной мембране: изменение температуры может влиять на «текучесть» мембраны, например, ускоряя (или замедляя) диффузию молекул PQ и PQH₂ в липидной части мембраны. Ускорение (или замедление) окисления PQH₂ в хинон-связывающем портале в комплексе Cyt $b_6 f$ может контролироваться физическим состоянием тилакоидной мембраны. Окисление PQH₂ — это процесс переноса электронов, связанный с высвобождением двух протонов в люмен. Температурно-индуцированное ускорение диссоциации протонов из PQH₂ через протон-проводящие каналы в комплексе Cyt $b_6 f$ будет способствовать окислению PQH₂.

На рис. 5 показаны температурные зависимости кинетического параметра $\tau_{1/2}$ в координатах Аррениуса, рассчитанные для метаболических состояний 3, 4 и 5. Параметр т_{1/2} — это время полувосстановления после освещения; его обратное значение $(\tau_{1/2}^{-1})$ характеризует скорость потока электронов от PQH_2 до $\Phi C1$. При любой заданной температуре $\tau_{1/2}$ имеет наибольшее значение в состоянии 4 («фотосинтетический контроль», максимальный ∆pH) и наименьшее значение в состоянии 5 (ДрН = 0). Это различие объясняется замедлением окисления PQH₂, вызванным закислением люмена. Время полувосстановления P_{700}^+ в состояниях 3 и 5 находится в диапазоне $\tau_{1/2} \approx 15-20$ мс [Tikhonov, Vershubskii, 2020]. Аналогичные значения $\tau_{1/2}$ были зарегистрированы для изолированных хлоропластов шпината [Haehnel, 1984] и хлоропластов бобов [Tikhonov et al., 1981, 1984]. Кинетические данные в виде графика Аррениуса традиционно используются для оценки энергий активации биохимических реакций. Видно, что во всех метаболических состояниях температурные зависимости переноса электронов в ФС1 обнаруживают характерные отклонения при $t_0 \approx 25$ °C. Низкотемпературная и высокотемпературная ветви температурной зависимости параметра $\tau_{1/2}$ характеризуются различными энергиями активации $E_a^{(1)}$ и $E_a^{(2)}$ соответственно, относятся к диапазонам температур ниже и выше t₀. В первом случае (ниже t₀) экспоненциальное ускорение переноса электронов с температурой характеризуется величиной $E_{\rm a}^{(1)} \sim 60 ~{\rm k} {\rm J} {\rm k} \cdot {\rm Mons}^{-1}$. При температурах выше t₀ стимулирующий эффект температуры незначителен или отсутствует ($E_{\rm a}^{(2)} \leq 3$ кДж·моль⁻¹). Этот результат может быть объяснен взаимодействием различных температурно-зависимых факторов, влияющих на поток электронов от PQH₂ к Φ C1 (через комплекс Cyt $b_6 f$ и Pc). Две ветви графика $au_{1/2}^{-1}$ в координатах Аррениуса могут быть объяснены балансом двух эффектов: (1) общей активацией эффективной скорости окисления PQH₂ температурой, которая доминирует в диапазоне температур ниже t_0 , и (2) уменьшением концентрации пластохинола и структурных переходов в липидных доменах мембраны (выше t_0). Оба фактора определяются параметризацией констант модели [Tikhonov, Vershubskii, 2020].



Рис. 5. Температурные зависимости $\tau_{1/2}$ скорости темнового полувосстановления P_{700}^+ (его обратной величины $\tau_{1/2}^{-1}$ в координатах Аррениуса), рассчитанные для метаболических состояний 3, 4 и 5, как указано на рисунке. (Теоретические кривые приведены по материалам работы [Tikhonov, Vershubskii, 2020])

На рис. 6 показано влияние температуры на стационарные концентрации P_{700}^+ (панель *a*) и PQH₂ (панель *б*). Примечательно, что в состояниях 3 и 4 концентрация $[P_{700}^+]$ изменяется незначительно с температурой, в то время как концентрация PQH₂ резко падает при температурах выше 30 °C. Таким образом, при достаточно высоких температурах (>30 °C) поток электронов от PQH₂ до Φ C1 не будет увеличиваться с температурой. Это является причиной относительно низких значений энергии активации $E_a^{(2)}$ (<3,5 кДж·моль⁻¹). Заметим, что в состоянии 5 график Аррениуса при t > 30 °C формально показывает отрицательное значение. Весьма вероятно, что это проявление обоих факторов: снижения концентрации пластохинола и ускоренного распада [P_{700}^+].

Как мы уже отмечали, закисление люмена ($pH_{in}\downarrow$) является существенным фактором контроля переноса электронов в хлоропластах (см. обзоры [Тихонов, 2012, 2013]). На рис. 6, *в* показаны стационарные значения pH_{in} , вычисленные для различных метаболических состояний. В состоянии 4 (когда общий поток протонов через комплекс CF_0 практически равен нулю) значение pH_{in} уменьшается более существенно, чем в состоянии 3 (когда протоны, находящиеся в просвете, могут выходить через активные комплексы CF_0 – CF_1). В обоих состояниях 3 и 4 люмен становится менее кислым с повышением температуры. Это можно объяснить зависящим от температуры ускорением оттока протонов из люмена через АТР-синтазу и пассивным потоком протонов.

Суммируя вышеизложенные результаты, можно заключить, что две ветви температурной зависимости скорости восстановления P_{700}^+ могут быть объяс-

нены наложением двух факторов, влияющих на общую скорость электронного потока от PQH₂ до Φ C1. Во-первых, при достаточно высоких температурах ($\geq 20-25$ °C) происходит истощение пула восстановленных молекул PQH₂ (рис. 6, δ), который служит источником доноров электронов, переносимых через комплекс Cyt b_6f и Pc. Это приводит к замедлению общего потока электронов к Φ C1. Во-вторых, изгиб на графике температурной зависимости может также отражать термоиндуцированные структурные изменения в тилакоидных мембранах.



Рис. 6. Стационарные концентрации P_{700}^+ (панель *a*) и PQH₂ (панель *б*), а также закисление люмена pH_{in} (панель *в*), рассчитанные для метаболических состояний 3, 4 и 5, как указано на рис. Компьютерное моделирование относится к «стандартной» модели ($t_0 = 25$ °C). Теоретические кривые приведены по материалам работы [Tikhonov, Vershubskii, 2020]

Две ветви температурной зависимости восстановления P⁺₇₀₀, описанные в рамках нашей модели, отражают взаимодействие нескольких процессов. Изгиб в температурной зависимости скорости восстановления может иметь как кинетические, так и структурные причины. Результаты наших расчетов подтверждают эту точку зрения. Рассматривая кинетический фактор, определяющий нециклический поток электронов, следует отметить, что поток электронов от PQH₂ к P⁺₇₀₀ (через комплекс Cyt $b_6 f$) будет ускоряться с концентрацией восстановленного PQH₂, т. е. $J_{\text{QH}_2 \rightarrow \text{P}^+_{700}} \sim [\text{PQH}_2]$. Чем выше концентрация PQH₂, тем быстрее доставляются электроны от пластохинола. Стационарная концентрация пластохинола определяется балансом между двумя процессами: (1) образованием PQH₂ в ФС2 и (2) окислением PQH₂ комплексом Cyt $b_6 f$. Модель предсказывает, что концентрация PQH₂ постепенно уменьшается при температурах выше 30 °C (рис. 6, δ). Таким образом, снижение концентрации пластохинола при достаточно высоких температурах, вызванное снижением активности ФС2, будет препятствовать межсистемному потоку электронов через комплекс Cyt $b_6 f$, что проявится в явном снижении $E_a^{(2)}$.



Рис. 7. Температурные зависимости стационарных потоков электронов от восстановленного ферредоксина (Fd⁻) до O₂ (J_{Fd-O2}), скорости образования ATP (V_{ATP}) от температуры, в метаболических состояниях 3, 4 и 5, рассчитанные для базовой модели, характеризующейся параметром $t_0 = 25^{\circ}$ С (панель *a*). На панели δ сравнивается температурная зависимость V_{ATP} и J_{Fd-O2} ; параметр P/2e = V_{ATP}/J_{Fd-O2} характеризует эффективность связывания переноса электронов с синтезом ATP. (Теоретические кривые приведены по материалам работы [Tikhonov, Vershubskii, 2020])

Другая причина снижения $E_a^{(2)}$ при $t \ge 25$ °C может быть связана с термоиндуцированными структурными изменениями в тилакоидах. Липиды обеспечивают диффузионную среду для молекул PQH₂, движущихся к PQH₂-связывающему порталу, расположенному внутри комплекса Cyt b₆f. «Затвердевание» мембранных липидов, вызванное снижением температуры ($\leq 20-25$ °C), должно препятствовать связыванию хинона с порталом в комплексе Cyt b₆f, замедляя, тем самым, окисление PQH₂. В противном случае псевдоожижение мембраны с повышением температуры ускорит окисление PQH₂. Увеличение подвижности молекул PQH₂ в мембране, вызванное «плавлением» липидов при достаточно высоких температурах (≥ 25°С), будет способствовать образованию субстратноферментного комплекса (PQH₂ $-b_6f$) и ускорит окисление пластохинола. Однако после перехода большей части мембранных липидов в «жидкое» состояние стимулирующее влияние температуры на перенос электронов будет маскироваться снижением концентрации PQH₂. Поэтому уменьшение концентрации пластохинола выше достаточно высоких температур (> t₀) будет проявляться как уменьшение эффективного активационного барьера.

Электронный транспорт, сопряженный с синтезом АТР

Рассмотрим теперь связь между нециклическим потоком электронов вокруг ФС1 и синтезом АТР в тилакоидах. На рис. 7, а представлены температурные зависимости стационарных потоков электронов от Fd⁻ до O₂ (J_{Fd-O2}), установленные в метаболических состояниях 3, 4 и 5, рассчитанные для $t_0 = 25$ °C. Эти участки имеют колоколообразную форму, с максимумами при 25 °C. Наиболее интенсивный поток электронов на кислород (J_{Fd-O2}) происходит в разобщенных хлоропластах (состояние 5, $\Delta pH = 0$), когда нециклический поток электронов не тормозится закислением люмена. В состояниях 3 и 4 потоки J_{Fd-O2} уменьшаются вследствие замедления переноса электронов между фотосистемами. На рис. 7, б сравниваются температурные зависимости V_{ATP} (скорости образования ATP) и $J_{\rm Fd-O2}$ (скорости переноса электронов). Отношение $V_{\rm ATP}/J_{\rm Fd-O2}$ соответствует экспериментально измеренному соотношению Р/2е (также называемому отношением АТР/О), которое традиционно используется в качестве меры эффективности энергетической связи в биоэнергетических системах [Rigoulet et al., 1998]. Экспериментально определенное соотношение Р/2е также увеличивается с температурой, достигая значения $\approx 0.8-1.2$ при 22–25 °C (в зависимости от условий эксперимента), но остается постоянным при более высоких температурах [Вершубский, Тихонов, 2021]. Рост отношения Р/2е можно объяснить, по крайней мере частично, вызванной температурой активацией АТР-синтазы. Соотношение Р/2е зависит от условий, в которых выделяются хлоропласты и анализируются их свойства. Можно также предположить, что состав мембранных липидов может влиять на синтез ATP из-за их влияния на транслокацию ионов H^+ от протонных насосов к протонным поглотителям (CF₀-субъединица ATP-синтазы) [Tikhonov, Vershubskii, 2020].

6. Заключение

Среди процессов регуляции фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах особый интерес представляют регуляторные механизмы, связанные с фотоиндуцированными изменениями pH стромы и люмена. Изменение внутритилакоидного pH является одним из главных факторов, контролирующих поток электронов между Φ C2 и Φ C1. Фотоиндуцированное уменьшение pH_{in} вызывает замедление переноса электронов на участке ЭТЦ, связанном с b_6f -комплексом, и запускает механизм, способствующий увеличению рассеяния энергии в светособирающей антенне Φ C2, препятствуя избыточному возбуждению реакционных центров Φ C2 и чрезмерному закислению люмена.

Моделирование световых стадий фотосинтеза, учитывающее pH-зависимую регуляцию ключевых стадий фотосинтетического транспорта электронов, позволило адекватно описать ряд закономерностей сложной кинетики электронтранспортных процессов в различных режимах работы хлоропластов. Показано, в частности, что многофазная кинетика фотоокисления P₇₀₀ определяется сменой лимитирующей стадии: переключение потоков электронов на акцепторном участке ФС1 и торможение электронного переноса между ФС2 и ФС1 за счет закисления люмена. Модель описывает переходы между метаболическими состояниями хлоропластов, обусловленные изменениями фосфатного потенциала за счет работы мембранной АТР-синтазы.

Анализ результатов численных экспериментов, выполненных в рамках нашей модели, показал, что наряду с такими механизмами регуляции переноса электронов между Φ C2 и Φ C1, как ослабление активности Φ C2 за счет нефотохимического тушения возбуждения хлорофилла в светособирающей антенне Φ C2, замедление окисления PQH₂ цитохромом *b*₆*f*-комплекса, защелачивание узкой щели между соседними тилакоидами граны [Vershubskii et al., 2017], учет тиоредоксин-зависимой активации ферментов ЦКБ и ATP-синтазы оказывает существенное влияние на длительность индукционной фазы и распределение потоков электронов на акцепторной стороне Φ C1.

Результаты моделирования термоиндуцированных структурных переходов в тилакоидных мембранах согласуются с представлением о том, что адаптация фотосинтетического аппарата высших растений к изменениям температуры окружающей среды может быть реализована путем изменения физических свойств липидных доменов тилакоидных мембран. Соответствие температурных зависимостей функциональных и структурных характеристик тила-

коидных мембран ранее было продемонстрировано методом ЭПР для различных препаратов хлоропластов бобов. Изменения микровязкости («текучести») липидных участков мембраны могут контролироваться температурноиндуцированными изменениями состава ненасыщенных и насыщенных липидов в тилакоидных мембранах. Сосуществование «жидкой» и «кристаллической» фаз в энергопреобразующих мембранах должно обеспечивать оптимальные условия работы фотосинтетического аппарата: высокая скорость работы ЭТЦ должна сочетаться со способностью тилакоидной мембраны поддерживать необходимый уровень ΔрН. Термоиндуцированное «разжижение» мембранных липидов может ускорять диффузию пластохинона и образование субстрат-ферментного комплекса PQH₂-b₆f, стимулировать генерацию ΔpH и ускорять синтез АТР. Однако при значительном повышении температуры усиливается пассивная утечка протонов из люмена в строму в обход АТРсинтазы, что вызывает уменьшение скорости синтеза АТР. Изменения физикохимических свойств тилакоидных мембран, связанные с «подгонкой» микровязкости липидного бислоя к заданной температуре, обеспечивают устойчивое функционирование фотосинтетического аппарата растений при колебаниях температуры окружающей среды.

Авторы признательны В. И. Приклонскому за помощь в разработке математической модели.

Работа выполнена в рамках исследования по теме «Физические основы строения, функционирования и регуляции биологических систем» физического факультета МГУ (01200408535) при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20047).

Литература

- Булычев А. А., Вреденберг В. Кинетика индукции активируемого фотосистемой I окисления Р700 в листьях растений и ее зависимость от преэнергизации // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 643–653.
- Вершубский А. В., Мишанин В. И., Тихонов А. Н. Моделирование регуляции фотосинтетического транспорта электронов у цианобактерий // Биологические мембраны. — 2014. — Т. 31. — С. 110–128.
- Вершубский А. В., Невьянцев С. М., Тихонов А. Н. Моделирование электронного и протонного транспорта в мембранах хлоропластов с учетом тиоредоксин-зависимой активации цикла Кальвина–Бенсона и АТР-синтазы // Биологические мембраны. 2018. Т. 35. С. 87–103.
- Вершубский А. В., Приклонский В. И., Тихонов А. Н. Электронный и протонный транспорт в хлоропластах с учетом латеральной гетерогенности тилакоидов. Математическая модель // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 471–481.

- Вершубский А. В., Приклонский В. И., Тихонов А. Н. Математическое моделирование электронного и протонного транспорта, сопряженного с синтезом ATP в хлоропластах // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 57–71.
- Вершубский А. В., Тихонов А. Н. рН-зависимая регуляция электронного и протонного транспорта в хлоропластах in situ и in silico // Биологические мембраны. 2019. Т. 36. С. 242–254.
- Вершубский А. В., Тихонов А. Н. Структурно-функциональные аспекты терморегуляции электронного транспорта и синтеза АТР в хлоропластах // Биохимия. — 2021. — Т. 86. — С. 109–124.
- Кукушкин А. К., Тихонов А. Н. Лекции по биофизике фотосинтеза высших растений. М.: Изд-во МГУ, 1988. 320 с.
- Рубин А. Б., Шинкарев В. П. Транспорт электронов в биологических системах. М.: Наука, 1984. 359 с.
- Рыжиков С. Б., Тихонов А. Н. Регуляция скорости переноса электрона в фотосинтетических мембранах высших растений // Биофизика. — 1988. — Т. 33. — С. 642–646.
- Тихонов А. Н. Энергетическая и регуляторная роль протонного потенциала в хлоропластах // Биохимия. — 2012. — Т. 77. — С. 1155–1176.
- Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез С₃- и С₄-растений: механизмы и регуляция. М.: Мир, 1986. 598 с.
- Albertsson P. A. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane // Trends Plant Sci. 2001. Vol. 6. P. 349–354.
- Balmer Y., Koller A., del Val G., Manieri W., Schürmann P., Buckanan B. B. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 370–375.
- Balsera M., Schurmann P., Buchanan B. B. Redox regulation in chloroplasts // Kirchhoff H. (ed.) Chloroplasts: current research and future trends. — Norfolk: Caister Academic Press, 2016. — P. 187–207.
- Banaś A. K., Aggarwal C., Łabuz J., Sztatelman O., Gabrys H. Blue light signalling in chloroplast movements // J. Exp. Botany. — 2012. — Vol. 63. — P. 1559–1574.
- Barber J., Ford R. C., Mitchell R. A., Millner P. A. Chloroplast thylakoid membrane fluidity and its sensitivity to temperature // Planta. 1984. Vol. 161. P. 375–380.
- Benkov M. A., Yatsenko A. M., Tikhonov A. N. Light acclimation of shade-tolerant and sunresistant Tradescantia species: photochemical activity of PSII and its sensitivity to heat treatment // Photosynth. Res. — 2019. — Vol. 139. — P. 203–214.
- Blankenship R. E. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Malden, MA: Blackwell Science Inc., 2002.
- Buchanan B. B. Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development // Arch. Biochem. Biophys. 1991. Vol. 288. P. 1–9.
- Dietz K.-J., Pfannschmidt T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression // Plant Physiol. 2011. Vol. 155. P. 1477–1485.

- Eberhard S., Finazzi G., Wollman F. A. The dynamics of photosynthesis // Annu Rev. Genet. 2008. Vol. 42. P. 463–515.
- Ford R. C., Chapman D. J., Barber J., Pedersen J. Z., Cox R. P. Fluorescence polarization and spin-label studies of the fluidity of stromal and granal chloroplast membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 681. — P. 145–151.
- Haehnel W. Photosynthetic electron transport in higher plants // Annu Rev. Plant. Physiol. 1984. Vol. 35. P. 659–693.
- Hu S., Ding Y., Zhu C. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants // Front Plant Sci. 2020. Vol. 11. P. 375. DOI: 10.3389/fpls.2020.00375.
- Kirchhoff H., Hall C., Wood M., Herbstová M., Tsabari O., Nevo R., Charuvi D., Shimoni E., Reich Z. Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2011. — Vol. 108. — P. 20248–20253.
- Kono M., Terashima I. Long-term and short-term responses of the photosynthetic electron transport to fluctuating light // J. Photochem. Photobiol. B. 2014. Vol. 137. P. 89–99.
- Laisk A., Nedbal N., Govindjee (eds.) Photosynthesis in silico. Understanding complexity from molecules to ecosystems. Springer, Dordrecht, 2009.
- Li Z., Wakao S., Fischer B. B., Niyogi K. K. Sensing and responding to excess light // Annu Rev. Plant Biol. 2009. Vol. 60. P. 239–260.
- Los D. A., Mironov K. S., Allakhverdiev S. I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // Photosynth. Res. 2013. Vol. 116. P. 489–509.
- Lutova M. I., Tikhonov A. N. Comparative study of temperature effects on the mobility of lipid-soluble spin label in thylakoid membranes of melon and cucumber chloroplasts // Biophysics. — 1988. — Vol. 33. — P. 460–464.
- Michelet L., Zaffagnini M., Morisse S., Sparla F., Pérez-Pérez M. E., Francia F., Danon A., Marchand C. H., Fermani S., Trost P., Lemaire S. D. Redox regulation of the Calvin– Benson cycle: something old, something new // Front. Plant Sci. — 2013. — Vol. 4, Article 470. — DOI: 10.3389/fpls.2013.00470.
- Mills J. D., Mitchell P. Thiol modulation of the chloroplast ATPase and its effect on photophosphorylation // Biochim. Biophys. Acta. — 1984. — Vol. 764. — P. 93–104.
- Minagawa J. State transitions the molecular remodeling of photosynthetic supercomp-lexes that controls energy flow in the chloroplast // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1807. P. 897–905.
- Mishanin V. I., Trubitsin B. V., Benkov M. A., Minin A. A., Tikhonov A. N. Light acclimation of shade-tolerant and light-resistant Tradescantia species: induction of chlorophyll a fluorescence and P₇₀₀ photooxidation, expression of PsbS and Lhcb1 proteins // Photosynth. Res. 2016. Vol. 130. P. 275–291.
- Nelson N., Yocum C. F. Structure and function of photosystems I and II // Annu. Rev. Plant. Biol. — 2006. — Vol. 57. — P. 521–565.

- Niu Y., Xiang Y. An overview of biomembrane functions in plant responses to hightemperature stress // Front Plant Sci. — 2018. — Vol. 9. — P. 915.
- Nolan W. G. Effect of temperature on proton efflux from isolated chloroplast thylakoids // Plant Physiol. 1981. Vol. 67. P. 1259–1263.
- Rigoulet M., Leverve X., Fontaine E., Ouhabi R., Guérin B. Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: dependence upon both fluxes and forces // Mol. Cell Biochem. — 1998. — Vol. 184. — P. 35–52.
- Rochaix J.-D. Regulation of photosynthetic electron transport // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1807. P. 375–383.
- Rubin A., Riznichenko G. Mathematical Biophysics. Series: Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering, XV. — 2014.
- Sawada S., Miyachi S. Effects of growth temperature on photosynthetic carbon metabolism in green plants I. Photosynthetic activities of various plants acclimatized to varied temperatures // Plant Cell Physiol. — 1974. — Vol. 15. — P. 111–120.
- Schuurmans J. J., Kraayenhof R. Energy-regulated functional transitions of chloroplast ATPase // Photochem. Photobiol. 1983. Vol. 37. P. 85–91.
- Suslichenko I. S., Tikhonov A. N. Photo-reducible plastoquinone pools in chloroplasts of Tradescentia plants acclimated to high and low light // FEBS Lett. — 2019. — Vol. 593. — P. 788–798.
- Tietz S., Puthiyaveetil S., Enlow H. M., Yarbrough R., Wood M., Semchonok D. A., Lowry T., Li Z., Jahns P., Boekema E. J., Lenhert S., Niyogi K. K., Kirchhoff H. Functional implications of Photosystem II crystal formation in photosynthetic Membranes // J. Biol. Chem. — 2015. — Vol. 290. — P. 14091–14106.
- Tikhonov A. N. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts // Photosynth. Res. — 2013. — Vol. 116. — P. 511–534.
- Tikhonov A. N., Khomutov G. B., Ruuge E. K. Electron transport control in chloroplasts. Effects of magnesium ions on the electron flow between two photosystems // Photobiochem. Photobiophys. 1984. Vol. 8. P. 261–269.
- Tikhonov A. N., Khomutov G. B., Ruuge E. K., Blumenfeld L. A. Electron transport control in chloroplasts. Effects of photosynthetic control monitored by the intrathylakoid pH // Biochem. Biophys. Acta. — 1981. — Vol. 637. — P. 321–333.
- Tikhonov A. N., Subczynski W. K. Application of spin labels to membrane bioenergetics (photosynthetic systems of higher plants), Chapter 8 // Biological Magnetic Resonance. — Vol 23. — Biomedical EPR – Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology / S. S. Eaton, G. R. Eaton, L. J. Berliner (eds.). — New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005. — P. 147– 194.
- Tikhonov A. N., Vershubskii A. V. Computer modeling of electron and proton transport in chloroplasts // BioSystems. 2014. Vol. 121. P. 1–21.
- Tikhonov A. N., Vershubskii A. V. Temperature-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts in vitro and in silico // Photosynth. Res. — 2020. — Vol. 146. — P. 299–329.

- Trubitsin B. V., Vershubskii A. V., Priklonskii V. I., Tikhonov A. N. Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in Hibiscus rosa-sinensis leaves // J. Photochem. Photobiol. B. — 2015. — Vol. 152. — P. 400–415.
- Vershubskii A. V., Kuvykin I. V., Priklonsky V. I., Tikhonov A. N. Functional and topological aspects of pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts in silico // Biosystems. — 2011. — Vol. 103. — P. 164–179.
- Vershubskii A. V., Trubitsin B. V., Priklonskii V. I., Tikhonov A. N. Lateral heterogeneity of the proton potential along the thylakoid membranes of chloroplasts // Biochim. Biophys. Acta. — 2017. — Vol. 1859. — P. 388–401.
- Wada M., Kagawa T., Sato Y. Chloroplast movement // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. Vol. 54. — P. 455–468.
- Witt H. T. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods // Biochim. Biophys. Acta. — 1979. — Vol. 505. — P. 355–427.
- Zhou Y., vom Dorp K., Dörman P., Hölzl G. Chloroplast lipids // Chloroplasts. Current research and Future Trends. — Caister Academic Press, 2016. — P. 1–24.

Oxygenic photosynthesis: mathematical modeling of electron and proton transport regulation in chloroplasts

A. V. Vershubskii, A. N. Tikhonov

Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia E-mail: an tikhonov@mail.ru

Photosynthesis is one of the most important biological processes in biosphere, which provides production of organic substances from atmospheric CO₂ at expense of solar energy. In this chapter, the main mechanisms of electron transport regulation in photosynthetic systems of the oxygenic type are considered. As a concrete example of computer modeling of photosynthetic processes, the kinetic model is explored, which includes the key stages of electron transport, alternative ways of electron transfer around photosystem 1 (PS1), transmembrane proton transfer, and ATP synthesis in chloroplasts. This model includes different regulatory processes: pH-dependent control of the intersystem electron transport, downregulation of photosystem 2 (PS2) activity (non-photochemical quenching), the light-induced activation of the Calvin-Benson cycle. Numerical experiments aimed at simulation of these processes under pseudocyclic electron transport (water-water cycle) have shown good agreement with experimental data on the kinetics of electron transfer to photosystem 1 (PS1) in class B chloroplasts in metabolic states corresponding to high (state 3) and low (state 4) ATP synthase activity. The simulation of electron transport processes that took into account the Calvin-Benson cycle (CBC), cyclic electron transport around PS1, pHdependent heat dissipation of energy in photosystem 2 (PS2), and nonphotochemical quenching (NPQ) made it possible to estimate the contribution of these factors to the kinetics of induction phenomena in

chloroplasts in situ. Comparison of the computed and experimental data on the kinetics of P_{700} photooxidation has shown that the consideration of thioredoxin-dependent activation of the CBC and the ATP synthase provides an adequate description of the multiphase kinetics of P_{700}^+ induction. Within the framework of our model, we could adequately describe a number of experimental temperature dependences of photosynthetic reactions in thylakoids. Computer modeling of electron and proton transport coupled to ATP synthesis supports the notion that PQH₂ oxidation by the Cyt $b_6 f$ complex and proton pumping into the lumen are the basic temperature-dependent processes that determine the overall electron flux from PSII to molecular oxygen and the net ATP synthesis upon variations of temperature. The model describes two branches of the temperature dependence of the post-illumination reduction of P_{700}^+ characterized by different activation energies (about 60 and $\leq 3,5$ kJ mol⁻¹).

Keywords: photosynthesis, chloroplasts, electron and proton transport, computer modeling.

ВЛИЯНИЕ ТРЕГАЛОЗЫ НА ПЕРЕНОС ЗАРЯДОВ В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2

*М. Д. Мамедов*¹, Л. А. Витухновская^{1, 2}, Г. Е. Милановский¹, А. Ю. Семенов^{1, 2, *}

В представленном обзоре описано влияние уникального по своим физико-химическим характеристикам дисахарида трегалозы на изолированные ядерные комплексы фотосистемы 2 (ФС2) при комнатной температуре. Показано, что при высушивании в стекловидной трегалозной матрице комплекс ФС2 может сохраняться в течение нескольких месяцев, хотя наблюдается частичное ингибирование переноса электрона от редокс-активного тирозина Y_Z на фотоокисленный первичный донор электрона P_{680} . При регидратации прямой перенос электрона полностью восстанавливается.

В обзоре также представлены результаты, свидетельствующие о стимулирующем влиянии трегалозы как на стационарную скорость светозависимого выделения кислорода, так и на реакцию выброса протонов при S-переходах комплекса окисления воды в ФС2. Важная часть обзора посвящена описанию данных о стабилизирующем влиянии этого биопротектора на генерацию разности электрических потенциалов при длительном постоянном освещении в полусинтетической системе на основе комплексов ФС2, иммобилизованных на мембранном фильтре, зажатом между двумя полупроводниковыми электродами.

Описанные результаты позволяют заключить, что трегалоза является чрезвычайно эффективным биопротектором и может быть использована при создании высокоэффективных преобразователей солнечной энергии в электрическую форму.

Ключевые слова: фотосистема 2, трегалоза, стекловидная матрица, биопротекторы, светозависимое выделение кислорода, комплекс окисления воды, разность электрических потенциалов.

1. Введение

Многие организмы, включая растения, бактерии и некоторые виды членистоногих, могут выживать длительное время при практически полном обезвоживании и высоких температурах, впадая в состояние обратимого ангидробиоза, при котором внутриклеточная среда содержит большое количество дисахаридов, в частности трегалозу и сахарозу. Трегалоза (см. рис. 1.1 слева) обеспечивает исключительно эффективную защиту различных биоструктур, включая целые организмы, клетки и выделенные белки [Williams, Gounaris, 1992; Jain,

¹ НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия.

² Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, 119991 Москва, ул. Косыгина, д. 4.

^{*} E-mail: semenov@genebee.msu.ru

Roy, 2009; Argüelles et al., 2017]. При высушивании трегалоза, в отличие от других дисахаридов, образует гомогенную аморфную стекловидную фазу, в которой молекулы распределены равномерно [Malferrari et al., 2014, 2015]. Белки, погруженные в подобную стекловидную матрицу, сохраняют функциональную активность при комнатной температуре длительное время [Malferrari et al., 2016]. Трегалоза образует сеть водородных связей с молекулами белка, включающую молекулы воды на поверхности белка и в окружающем матриксе (см. рис. 1.1 справа, а также недавние обзоры [Gorka et al., 2015; Möbius et al., 2021]).



Рис. 1.1. Химическая структура трегалозы (слева) и схема взаимодействия трегалозной матрицы с погруженным в нее белком (справа). Рисунок справа взят из обзора [Möbius et al., 2021]

Отличительным свойством трегалозы является ее относительно высокая температура стеклования ($T_g = 117$ °C для обводненной формы) [Jain, Roy, 2009], что существенно выше, чем, например, у схожего по структуре дисахарида сахарозы (65 °C). Температура плавления сухой трегалозы ($T_m = 399$ K) очень близка к ее температуре стеклования ($T_g = 398$ K) [Sussich, Cesaro, 2008], поэтому данный дисахарид не может существовать в переохлажденном жидком состоянии в отсутствие воды. В отличие от глицерина, температура стеклования водно-трегалозных смесей сильно зависит от молярной доли воды; при добавлении всего лишь одной молекулы воды на одну молекулу трегалозы T_g снижается уже до 40 °C [Chen et al., 2000]. За счет этого даже умеренно гидратированная трегалоза при комнатной температуре находится в стекловидном твердом состоянии. Любые белки, встроенные в эту витрифицированную матрицу, будут иметь значительно сниженную конформационную подвижность. Диффузионная подвижность в переохлажденных растворах воды/трегалозы хорошо

совпадает с другими дисахаридами [Magazu et al., 1999]. Аналогичным образом, температура плавления и температура стеклования разбавленных смесей вода/трегалоза также близки к таковым для сахарозы и других сахаридов [Wang, Haymet, 1998].

Дополнительным свойством, которое помогает трегалозе стабилизировать клетки и биологические макромолекулы, является ее склонность к взаимодействую с окружающими молекулами воды. Трегалоза считается космотропом [Branca et al., 2005; Lerbret et al., 2005; Kilburn et al., 2006], т. е. она способна упорядочивать молекулы окружающей воды. Более того, подобное взаимодействие растворяемого вещества с растворителем оказывается сильнее, чем взаимодействие между молекулами растворителя. Данное свойство приводит к снижению подвижности воды в небольших объемах вокруг молекул трегалозы. Преимущественное образование водородных связей с водой также влияет на сольватацию биомолекул и образование ими водородных связей.

Еще одной особенностью трегалозы является способность к образованию внутримолекулярных водородных связей между двумя ее сахаридными кольцами при высокой молярной концентрации сахара. Когда количество воды вокруг трегалозы увеличивается, молекула трегалозы раскрывается подобно книге, что позволяет резко увеличить количество связанных с ней молекул воды [Elias, Elias, 1999]. Возможно, в наибольшей степени биопротекторные свойства трегалозы объясняются ее способностью разрушать тетраэдрическую сеть молекул воды непосредственно в окружающем объеме. Упорядочивая окружающие молекулы, трегалоза предотвращает кристаллизацию при низких температурах за счет уменьшения количества замерзающей воды [Wang, Haymet, 1998; Branca et al., 1999].

Исследования в области взаимодействия трегалозы с белками привели к созданию нескольких моделей механизма стабилизации биологических макромолекул, которые не являются взаимоисключающими.

1. Модель высокой вязкости постулирует, что жесткость стекловидной трегалозной матрицы затрудняет и существенно снижает конформационную подвижность белков [Sampedro, Uribe, 2004]. Подобная витрифицированная матрица, обеспечиваемая высоким значением T_g трегалозы, способствует сохранению белка в нативной конформации.

2. Модель захвата воды также предполагает, что трегалозная матрица снижает подвижность белка, что приводит к стабилизации биомолекулы, но, в основном, за счет космотропных свойств трегалозы [Belton, Gil, 1994]. Преимущественная сольватация дисахарида молекулами воды приводит к образованию небольшой стабильной водной прослойки, сольватирующей белок. Эта сольватная оболочка удерживается водородными связями между водой и окружающей трегалозной матрицей (при отсутствии прямых связей между трегалозой и белком). В такой структуре существенные отклонения от нативной конформации будут нарушать сопряжение между белком и окружающим матриксом и будут термодинамически невыгодными.

3. Модель замещения воды предполагает, что процесс дегидратации белка в водно-трегалозной матрице обязательно приводит к уменьшению количества молекул воды, способных к образованию водородных связей с белком [Carpenter, Crowe, 1989; Allison et al., 1999]. Водородные связи с белком обеспечиваются молекулами трегалозы, которые по своей природе являются более жесткими и стерически объемными, чем молекулы воды. Хотя этот эффект наблюдается в первую очередь на поверхности белка, в конечном счете это приводит к ограничению общей подвижности белка.

4. Якорная модель объединяет различные аспекты предыдущих моделей, предполагая, что молекулы остаточной воды на поверхности белка после высушивания прочно связаны как с матрицей трегалозы, так и с белком [Cordone et al., 2005; Francia et al., 2009; Savitsky et al., 2010]. Связывание белка с водным слоем в сочетании с жесткостью окружающей трегалозной матрицы сильно ограничивает подвижность поверхности белка, делая как крупномасштабные, так и мелкомасштабные движения термодинамически невыгодными.

Фотосинтетические пигмент-белковые комплексы бактериальных реакционных центров (PU), а также более сложные комплексы фотосистем (Φ C) 1 и 2 оксигенных организмов хорошо подходят в качестве объектов для изучения механизма эффективного протекторного действия трегалозы. На этих объектах можно регистрировать светозависимую кинетику прямых и обратных реакций переноса электрона в широком временном диапазоне и при различных экспериментальных условиях. В настоящее время влияние биопротекторов, в первую очередь трегалозы, на функциональную активность белков наиболее детально исследовано на относительно небольших мембранных белковых комплексах, РЦ, выделенных из пурпурных фотосинтезирующих бактерий [Palazzo et al., 2002; Francia et al., 2003; Malferrari et al., 2014; Shelaev et al., 2016]. В последние годы нами была опубликована серия работ по исследованию влияния относительной влажности на кинетику прямых и обратных реакций переноса электрона в более сложно организованных пигмент-белковых комплексах ФС1 из цианобактерий в стекловидной трегалозной матрице [Malferrari et al., 2015, 2016; Kurashov et al., 2018].

Было показано, что при понижении влажности в трегалозной матрице постепенно происходит замедление переноса электрона с филлохинонных акцепторов A_{1A} и A_{1B} на 4Fe-4S-кластер F_X и на терминальные 4Fe-4S-кластеры F_A/F_B . При этом за счет прекращения прямого переноса электрона происходит ускорение кинетики рекомбинации зарядов. При максимальном высушивании (до 11 % влажности) рекомбинация наблюдается только с F_X , A_{1A} и A_{1B} . Наблюдаемая кинетика рекомбинации зарядов становится неэкспоненциальной, подобно тому, как это происходит при охлаждении водно-глицериновой смеси ниже температуры стеклования окружающего раствора [Milanovsky et al., 2019]. Было выдвинуто предположение, что это сходство обусловлено ограничением конформационной подвижности белка Φ C1, которое приводит к замедлению прямых реакций и прекращению переноса электрона на периферических участках белка. По-видимому, распределенная кинетика рекомбинации зарядов на фото-окисленный первичный донор электрона P_{700}^+ обусловлена фиксацией конформационных состояний белка, как это наблюдается при низкой температуре.

В настоящем обзоре рассмотрено влияние трегалозы в растворе и стекловидной матрице на наиболее сложно устроенный фотосинтетический реакционный центр — комплекс ФС2. Комплекс ФС2 осуществляет светозависимое окисление воды до молекулярного кислорода на люменальной и восстановление пластохинона до пластогидрохинона на стромальной сторонах тилакоидной мембраны (см. обзоры [Barber, 2006; Kern, Renger, 2007; Koochak et al., 2019]). Структура ядерного комплекса ФС2, содержащего два антенных белка (СР47 и СР43), РЦ (состоящий из субъединиц D1D2 и цитохрома b559) и ряд низкомолекулярных белков, была выявлена благодаря рентгеноструктурному анализу кристаллов ФС2 из термофильных цианобактерий и растений [Umena et al., 2011; Suga et al., 2015; Wei et al., 2016]. Все основные компоненты ФС2 — димер хлорофилла (Хл) *а* Р₆₈₀, мономер Хл *а*, феофитин *а*, первичный (Q_A) и вторичный (Q_B) хинонные акцепторы, редокс-активный аминокислотный остаток тирозина Y_Z (Tyr-161 белка D1) и Mn₄Ca-кластер, участвующие в трансмембранном переносе зарядов, — локализованы на D1- и D2-белках РЦ. Следует отметить, что комплекс окисления воды (КОВ), который расположен на донорной стороне пигмент-белкового комплекса, является наиболее лабильным сайтом в ФС2 и подвержен повреждению при различных абиотических стрессовых условиях.

Индуцированное единичной вспышкой света разделение зарядов в РЦ Φ C2 приводит к окислению P_{680} и восстановлению Q_A до Q_A^- , за которым следует восстановление катион-радикала P_{680}^+ путем переноса электрона от редоксактивного тирозина Y_Z . Восстановление радикала Y_Z^- осуществляется путем переноса электрона от молекулы воды с участием марганцевого кластера Mn₄CaO₅. На акцепторной стороне РЦ Φ C2 происходит восстановление Q_B в результате переноса электрона от Q_A^- . Следующая вспышка света вновь вызывает перенос электрона от P_{680} на Q_A^- , дальнейшее окисление марганцевого кластера и протонирование дважды восстановленного пластохинона $Q_B (Q_B^{2-})$ с образованием пластохинола (Q_BH_2). При последовательных четырех вспышках света марганцевый кластер проходит через пять кинетических интермедиатов или S-состояний, обозначаемых S_i (i = 0-4) [Shevela, Messinger, 2012;

Vinyard, Brudvig, 2017]. После четырехступенчатого окисления от S₀ до S₄ KOB окисляет две молекулы воды с образованием одной молекулы кислорода. При этом четыре протона переносятся от марганцевого кластера или его ближайше-го белкового окружения в водную фазу в соотношении 1:0:1:2 при переходах $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$, в то время как перенос одного электрона происходит на каждый отдельный переход (схема переходов между S-состояниями приведена ниже на рис. 3.2) [Shevela, Messinger, 2012; Najafpour et al., 2016; Zaharieva, Dau, 2019; Cox et al., 2020].

Одними из широко исследуемых препаратов комплексов Φ C2 являются образцы, лишенные Mn-кластера, в которых полностью ингибируются окисление воды и выделение кислорода. В подобных комплексах Φ C2 индуцированное световыми вспышками разделение зарядов между P_{680} и Q_A сопровождается восстановлением P_{680}^+ от Y_Z . Вслед за этим, в отсутствие эффективных экзогенных доноров и акцепторов электрона, происходит рекомбинация зарядов, главным образом, между Q_A^- и окисленным радикалом Y_Z^* . В отличие от интактных ядерных комплексов Φ C2, эти реакции восстановления P_{680}^+ протекают в диапазоне времен, удобном для наблюдений (от мкс до десятков мс).

В разделе 2 описан биопротекторный эффект трегалозы при высушивании лишенных Мп-кластеров комплексов ФС2 в стекловидной матрице на светозависимый перенос электронов. Далее, в разделе 3 представлены данные о влиянии трегалозы на выделение кислорода и образование трансмембранной разности электрических потенциалов в ядерных комплексах ФС2 в водном растворе детергента и протеолипосомах.

2. Кинетика переноса электрона в комплексах ФС2, лишенных Mn-кластера, в стекловидной трегалозной матрице

При высушивании в стекловидной трегалозной матрице препараты ФС2 дегидратировали путем уравновешивания при относительной влажности (r) 11 % в присутствии насыщенного раствора LiCl, что соответствует молярному соотношению H₂O/трегалоза \approx 1,2. ФС2 затем регидратировали путем инкубации с различными насыщенными растворами солей, создающими над раствором специфическую относительную влажность воздуха: r = 33 % (MgCl₂, H₂O/трегалоза \approx 2), r = 43 % (K₂CO₃, H₂O/трегалоза \approx 2,7), r = 63 % (NH₄NO₃, H₂O/трегалоза \approx 4,5) и r = 74 % (NaCl, H₂O/трегалоза \approx 9,2) [Greenspan, 1977]. При r > 74 % стекловидная матрица переходила в жидкое патокообразное состояние.

На рис. 2.1 представлены кинетические кривые индуцированных лазерной вспышкой изменений поглощения на длине волны 820 нм (ΔA_{820}), отражающих редокс-переходы первичного донора электрона в $\Phi C2 P_{680} (P_{680}^{-}/P_{680}^{-+})$. Началь-

ное увеличение поглощения соответствовало образованию окисленного состояния P_{680}^{+} , а последующий спад ΔA_{820} — восстановлению P_{680}^{+} с образованием исходного состояния P_{680} . На рисунке приведены кинетики восстановления P_{680}^{+} в растворе (*a*), в стекловидной трегалозной матрице при r = 74 % (*b*), при r = 11 % (*c*) и при регидратировании (после добавления воды и перехода трегалозной матрицы с ФС2 со стеклянной подложки в раствор) (*d*).



Рис. 2.1. Влияние относительной влажности стекловидной трегалозной матрицы на кинетику восстановления фотоокисленного димера P_{680}^+ в комплексах Φ C2, лишенных Mn-кластера (рисунок взят из статьи [Mamedov et al., 2021])

Как в растворе (кривая *a*), так и в стекловидной матрице наблюдалась многокомпонентная кинетика, охватывающая более чем три порядка по времени. Включение комплекса ФС2 в трегалозное стекло и дегидратация при r = 11 % (кривая *c*) приводили к значительному замедлению кинетики восстановления P_{680}^+ по сравнению с раствором. При увлажнении стеклообразной матрицы вплоть до r = 74 % (кривая *b*) наблюдаемая кинетика ускорялась, но оставалась существенно более медленной, чем в растворе. Эффект замедления восстановления P_{680}^+ в высушенной трегалозной матрице был практически полностью обратимым после регидратации образца (кривая *d*).

При анализе кинетики восстановления P_{680}^{+} было обнаружено, что процесс спада ΔA_{820} во всех случаях хорошо аппроксимируется четырьмя экспоненциальными компонентами. В растворе и после регидратации трегалозного стекла кинетика определяется двумя основными быстрыми компонентами (фазы 1 и 2) с характерными временами, равными $\tau_1 = 2$ и $\tau_2 = 6$ мкс, и суммарным вкладом ~ 90 %. Две минорные более медленные компоненты (фазы 3 и 4) характеризуются значениями $\tau_3 = 30$ мкс и $\tau_4 = 400$ мкс. При высушивании ФС2 в трегалозной матрице и последовательном дегидратировании образца наблюдается замедление кинетики (рис. 2.1, кривые *b* и *c*) и увеличение амплитуд медленных компонент 3 и 4 за счет понижения вклада быстрых компонент 1 и 2 (рис. 2.2). Этот эффект начинает наблюдаться уже при соотношении 9 молекул воды на одну молекулу трегалозы. При этом τ_1 замедляется примерно в 2 раза, а τ_2 , τ_3 и τ_4 — в 4–5 раз. Дальнейшее дегидратирование трегалозной матрицы до молярного соотношения H₂O/трегалоза, равного 4, не приводило к существенному изменению кинетики, но суммарный вклад амплитуд быстрых компонент уменьшался, а вклад медленных компонент увеличивался до ~ 50 %. Дальнейшая дегидратация образцов вплоть до соотношения H₂O/трегалоза, равного 1, не приводила к существенным изменениям кинетики и амплитуд компонентов.



Рис. 2.2. Влияние молярного соотношения H_2O /трегалоза на относительный вклад медленных (фазы 1 и 2) и быстрых (фазы 3 и 4) кинетических компонент восстановления фотоокисленного P_{680} ФС2 в растворе и стекловидной трегалозной матрице (рисунок взят из статьи [Mamedov et al., 2021])

Ранее на препаратах ФС2, лишенных Mn, было показано, что перенос электрона от редокс-активного тирозина Y_Z на фотоокисленный димер хлорофилла P_{680}^+ происходит в диапазоне 4–10 мкс [Conjeaud, Mathis, 1980; Schlodder, Meyer, 1987]. В более поздней работе было продемонстрировано наличие в кинетике восстановления фотоокисленного P_{680}^+ трех фаз с характерными временами жизни τ , равными 1,5, 10–20 и 450 мкс [Ahlbrink et al., 1998]. Две более быстрые компоненты, составляющие более 80 % от суммарного сигнала, были приписаны прямому донированию электрона от Y_Z на P_{680}^+ , а более медлен-

ная — рекомбинации зарядов между восстановленным хинонным акцептором ${Q_A}^-$ и ${P_{680}}^+.$

На основании этих данных мы предположили, что наблюдаемые нами кинетические фазы 1 и 2 обусловлены переносом электрона от Y_Z на P_{680}^{++} , а фазы 3 и 4 — рекомбинацией зарядов в ион-радикальной паре $P_{680}^{++}Q_A^{--}$. Действительно, мультиэкспоненциальная кинетика рекомбинации $P_{680}^{++}Q_A^{--}$ наблюдалась при более кислых значениях pH и в условиях, когда Y_Z частично находился в окисленном состоянии [Ahlbrink et al., 1998; Gerken et al., 1989; Hillmann, Schlodder, 1995]. Объяснение медленных компонент 3 и 4 рекомбинацией зарядов между Q_A^{--} и P_{680}^{++} подкрепляется тем фактом, что амплитуды обеих кинетических фаз снижаются одинаковым образом при дегидратировании трегалозной стекловидной матрицы.

Результаты, представленные на рис. 2.2, четко показывают, что сумма амплитуд быстрых кинетических компонент 1 и 2 падает синхронно с увеличением суммы амплитуд медленных компонент 3 и 4. При этом практически равный вклад суммы двух быстрых и двух медленных компонент не меняется при дальнейшем уменьшении соотношения H₂O/трегалоза вплоть до значения 1. Зависимость отдельных кинетических компонент от степени дегидратации трегалозной стекловидной матрицы свидетельствует о том, что как перенос электрона от Y_Z на P₆₈₀⁺, так и рекомбинация зарядов между Q_A⁻ и P₆₈₀⁺ замедляются при понижении отношения H₂O/трегалоза, но последняя реакция замедляется более существенно.

На рис. 2.3 показаны некоторые редокс-кофакторы в структуре ФС2, необходимые для иллюстрации наблюдаемых в экспериментах реакций прямого и обратного переноса электрона. Синими стрелками изображены две последовательные реакции прямого переноса: (1) от P_{680} на Q_A с образованием ионрадикальной пары $P_{680}^+Q_A^-$ и (2) от тирозина Y_Z на P_{680}^+ . При этом реакция (1) соответствует в эксперименте неразрешаемому во времени скачкообразному увеличению ΔA_{820} , а реакция (2) последующему восстановлению P_{680}^+ от Y_Z , проявляющемуся как спад сигнала ΔA_{820} во временном диапазоне $\tau_1 \approx 2-5$ и $\tau_2 \approx$ $\approx 5-20$ мкс. Две более медленные кинетические компоненты $\tau_3 \approx 30-170$ мкс и $\tau_4 \approx 400-1500$ мкс относятся к рекомбинации зарядов между Q_A^- и P_{680}^+ . Эта обратная реакция переноса электрона изображена на рис. 2.3 красной стрелкой.

Последовательное блокирование переноса электрона от Y_Z на P_{680} , наблюдаемое при комнатной температуре в трегалозной матрице при уменьшении содержания воды, сходно с аналогичным процессом, наблюдавшимся в воднотрегалозном растворе при понижении температуры от 300 до 200 К [Schlodder et al., 2015]. Отметим, что сходные эффекты наблюдались для прямых реакций в других фотосинтетических РЦ, в частности, для переноса от первичного (Q_A) ко вторичному (Q_B) хинонному акцептору в бактериальных РЦ из *Rhodobacter* *sphaeroides* [Kleinfeld et al., 1984; Xu, Gunner, 2001], а также для переноса электрона от железо-серного кластера F_X на терминальные акцепторы F_A/F_B и от филлохинона A_1 на F_X [Malferrari et al., 2016; Kurashov et al., 2018; Milanovsky et al., 2019].



Рис. 2.3. Расположение редокс-кофакторов в пигмент-белковом комплексе Φ C2. Первичный донор электронов P_{680} изображен оранжевым, первичный хинонный акцептор — фиолетовым, тирозин Y_Z — зеленым. Комплекс окисления воды (КОВ) изображен в виде сфер с вандерваальсовыми радиусами. Синие стрелки отражают прямой перенос электрона от P_{680} на Q_A и от тирозина Y_Z на фотоокисленный P_{680} , красная стрелка — обратный перенос электрона от Q_A^- на P_{680}^+

Для объяснения последовательного ингибирования окисления Y_Z при понижении температуры Шлоддер и соавторы [Schlodder et al., 2015] предложили два альтернативных объяснения: (а) гетерогенное ингибирование переноса электрона вследствие замораживания белка в различных конформационных состояниях и (б) гомогенное ингибирование, обусловленное зависимым от температуры свободной энергии реакции ΔG^0 . В случае дегидратации трегалозной матрицы при комнатной температуре происходит существенное ограничение конформационной подвижности белка вследствие тесного динамического взаимодействия между белком и постепенно затвердевающим сахаридным матриксом [Cordone et al., 2005; Milanovsky et al., 2019; Cottone et al., 2019]. Повидимому, в случае Φ C2, инкорпорированной в трегалозную матрицу, при последовательной дегидратации также наблюдается гетерогенное ингибирование реакций переноса электрона, обусловленное фиксацией возрастающей фракции белка в неактивных конформационных состояниях.

3. Влияние трегалозы на интактные комплексы фотосистемы 2 в водном растворе и протеолипосомах

3.1. Влияние трегалозы на светозависимое выделение кислорода в ФС2

На рис. 3.1 показано, что светозависимая стационарная скорость выделения кислорода на мембранных фрагментах и ядерных комплексах ФС2 из шпината существенно стимулируется в присутствии высоких концентраций трегалозы.



Рис. 3.1. Влияние трегалозы на скорость выделения кислорода в ядерных комплексах ФС2 (а) и мембранных фрагментах ФС2 (б) в среде, содержавшей 25 мМ Mes (pH 6,5), 15 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, в отсутствие (1) или в присутствии 0,5 M (2) или 1 M (3) трегалозы. В качестве акцепторов электронов были использованы K₃[Fe(CN)₆] (1 мМ) и 2,6-дихлоро-п-бензохинон (0,1 мМ). Концентрация хлорофилла в образцах составляла 2 мкг·мл⁻¹. (Рисунок взят из статьи [Мамедов и др., 2015]

Для определения возможного сайта взаимодействия трегалозы с Φ C2 измерения скорости выделения кислорода (VO₂) проводили как в растворе, так и на протеолипосомах со встроенными препаратами ядерных комплексов Φ C2. В таблице 1 показаны результаты, полученные для ядерных частиц Φ C2 в растворе и протеолипосомах при стационарном освещении в отсутствие и в присутствии 1 М трегалозы. Представленные данные показывают, что как абсолютные значения VO₂, так и стимуляция в присутствии 1 М трегалозы в растворе и протеолипосомах достаточно близки. Ранее нами было продемонстрировано, что при встраивании в протеолипосомальную мембрану комплекс Φ C2 ориентирован донорной стороной наружу от протеолипосом [Gopta et al., 2008]. Поскольку мембраны протеолипосом практически непроницаемы для трегалозы,

то можно сделать вывод, что близкие значения стимуляции VO₂ в растворе (увеличение в 2,4 раза) и в протеолипосомах (увеличение в 2,3 раза) свидетельствуют о том, что стимулирующий эффект трегалозы практически полностью обусловлен ее взаимодействием с КОВ, локализованным с наружной стороны протеолипосомальной мембраны.

Таблица 1. Влияние 1 М трегалозы на стационарную скорость выделения кислорода в ядерных комплексах ФС2

Образец	(µмоль O_2) мг $^{-1}$ ·Chl $^{-1}$ ·ч $^{-1}$
ФС2 в растворе	1,400
ФС2 в растворе + трегалоза	3,340
Протеолипосомы с ФС2	1,300
Протелипосомы с ФС2 + трегалоза	3,000

3.2. Влияние трегалозы на электрогенные стадии в комплексе окисления воды ФС2

Как продемонстрировано в предыдущем разделе, трегалоза стимулирует светозависимое выделение кислорода ядерными комплексами ФС2. На рис. 3.2 показан цикл редокс-переходов КОВ между S-состояниями в ответ на последовательные четыре вспышки света. При этом первая вспышка (переход $S_1 \rightarrow S_2$) инициирует окисление первичного донора электрона — димера хлорофилла P_{680} , сопровождающееся восстановлением P_{680}^+ от редокс-активного тирозина Y_Z , который, в свою очередь, восстанавливается от иона Mn (реакции $Y_Z(red)/Y_Z(ox) \rightarrow P_{680}^+/P_{680}$ и Mn $\rightarrow Y_Z(ox)/Y_Z(red)$). Все последующие вспышки (2–4) также индуцируют эти реакции, но, кроме того, переходы $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ и $S_0 \rightarrow S_1$ сопровождаются выбросом протонов.

Ранее на протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2, с помощью прямого электрометрического метода было показано, что переходы между S-состояниями в ответ на последовательные вспышки света сопровождаются электрогенными реакциями [Haumann et al., 1997; Мамедов и др., 1999]. Было обнаружено, что в ответ на каждую вспышку света наблюдается быстрое образование мембранного потенциала ($\Delta \psi$), обусловленное переносом электрона от P₆₈₀ на первичный пластохинонный акцептор Q_A (характерное время $\tau \approx 200$ пс), сопровождающееся восстановлением P₆₈₀⁺ от Y_Z(red) $\tau \approx 30$ –300 нс, а также переносом электрона от Mn на Y_Z(ох) ($\tau \approx 30$ мкс). Прямой электрометрический метод имеет временное разрешение ~ 200 нс, поэтому кинетика двух первых реакций не может быть разрешена. Кроме того, фотоэлектрические ответы на 2-ю и 3-ю вспышки содержали дополнительные электрогенные компоненты со значениями τ , равными 250 мкс и 5 мс. Было показано, что эти ком-

поненты обусловлены электрогенным выбросом протонов, сопровождающим переходы между состояниями $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$. На препаратах ФС2, адаптированных к темноте, атом негемового железа находится в частично окисленном состоянии. Поэтому в ответ на первую из серии последовательных вспышек, в кинетике генерации $\Delta \psi$, кроме вышеописанных последовательных реакций переноса электрона, наблюдается электрогенное протонирование белка, связанное с восстановлением Fe³⁺ до Fe²⁺ на акцепторном участке ФС2. Однако в следующем цикле из четырех последовательных вспышек атом железа полностью восстановлен. Поэтому для выявления электрогенных реакций, связанных с переходами между S-состояниями, вместо первой использовали пятую вспышку. Таким образом, 30-микросекундная кинетическая компонента образования $\Delta \psi$ в ответ на пятую вспышку отражала кинетику перехода $S_1 \rightarrow S_2$.



Рис. 3.2. Цикл переходов между S-состояниями КОВ Φ C2 в ответ на последовательные вспышки света. Y_Z — редокс-активный тирозин. Синими стрелками показан электрогенный перенос электрона от иона Mn в КОВ на фотоокисленный тирозин Y_Z , наблюдаемый в ответ на каждую вспышку света. Зелеными стрелками показан электрогенный выброс протонов, а пунктирными стрелками — неэлектрогенный выброс протонов

На рис. 3.3 показана кинетика образования $\Delta \psi$ в ответ на вторую и пятую последовательные вспышки света на протеолипосомах, содержащих ФС2. Отрицательный знак $\Delta \psi$ показывает, что донорная сторона ФС2 расположена на внешней поверхности мембраны протеолипосомы [Мамедов и др., 1999; Gopta et al., 2008]. На рисунке видно, что в кинетике фотоэлектрического ответа на пятую вспышку имеется небольшая компонента во временном диапазоне десятков микросекунд, тогда как в кинетике фотоответа на вторую вспышку появляется большая по амплитуде и более медленная компонента [Наиmann et al., 1997; Semenov et al., 2008; Mamedov et al., 2010].


Рис. 3.3. Разница между фотоэлектрическими ответами, индуцированными второй и пятой лазерными вспышками. Стрелкой указан момент вспышки лазера. Среда инкубации содержала 25 мМ MES (pH 6,5), 15 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂. (Рисунок взят из статьи [Петрова и др., 2013])

Для выявления кинетики электрогенеза, обусловленного переходом $S_2 \rightarrow S_3$, была использована разница между кинетическими кривыми, индуцированными второй и пятой вспышками света (кривая 2–5 на врезке к рис. 3.3). Аналогичным образом, для выявления кинетики перехода $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ была использована разница между кинетическими кривыми, индуцированными третьей и пятой вспышками света [Мамедов и др., 1999; Mamedov et al., 2010]. Данные по относительным амплитудам и кинетикам электрогенных реакций, сопровождающих переходы между S-состояниями, приведены в таблице 2.

В присутствии 1 М трегалозы относительные амплитуды соответствующих электрогенных компонент не менялись, но кинетика электрогенной реакции при переходе $S_2 \rightarrow S_3$ ускорялась в 1,6 раза, а кинетика при переходе $S_3 \rightarrow \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0 -$ в 2,4 раза (таблица 2). Таким образом, можно предположить, что ускорение кинетики электрогенного выброса протонов, наблюдаемое при добавлении трегалозы, является причиной описанного в предыдущем разделе увеличения скорости выделения кислорода ядерными комплексами ФС2 в присутствии этого биопротектора.

Полученные данные демонстрируют, что дисахарид трегалоза не влияет на кинетику транспорта электронов между ионом марганца и редокс-активным радикалом тирозина Y_Z (переход $S_1 \rightarrow S_2$), индуцированного первой и всеми

последующими вспышками лазера, в то время как ускоряет кинетику электрогенного транспорта протонов при переходах $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_4 \rightarrow S_0$.

Таблица 2. Электрогенные реакции на донорной стороне интактного ядерного комплекса ФС2

Образец	$S_1 \rightarrow S_2$	$S_2 \rightarrow S_3$	$S_4 \rightarrow S_0$
Яперина постник ФС2	~ 3 %	~ 5 %	~ 5 %
лдерные частицы ФС2	(30-65 мкс)	(240-270 мкс)	(~4-6 мс)
	~ 3 %	~ 5 %	~ 5 %
лдерные частицы ФС2 + трегалоза	(40-50 мкс)	(150-160 мкс)	(~ 2,0–2,2 мс)

Указаны относительные амплитуды (в процентном отношении к быстрой фазе, соответствующей образованию $Y_z Q_A^-$) и времена жизни (в скобках) электрогенных реакций при переходах S-состояний [Haumann et al., 1997; Мамедов и др., 1999; Петрова и др., 2013].

Ускорение электрогенного выброса протона при переходах $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_4 \rightarrow S_0$ в присутствии трегалозы (таблица 2), вероятно, означает, что в дополнение к субъединице D1 РЦ внешний белок 33 кДа (также называемый Mn-стабилизирующим белком), соединяющий активный центр KOB с водной фазой, также принимает участие в переносе протонов [Shutova et al., 2007; Shoji et al., 2013; Najafpour et al., 2016]. Пути внутрибелкового переноса протона требуют определенного расположения и взаимной ориентации молекул воды, а также наличия сети водородных связей между молекулами воды и белком, и контролируются конформационной подвижностью белка. Было предположено, что переходы $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_4 \rightarrow S_0$ являются более чувствительными к структурным изменениям, вызванным дегидратацией [Noguchi, Sugiura, 2002].

Таким образом, можно заключить, что трегалоза увеличивает скорость выделения кислорода, вероятнее всего, за счет стабилизации системы внутрибелковых водородных связей, обеспечивающей ускорение электрогенного выброса протонов КОВ ФС2.

3.3. Влияние трегалозы на генерацию разности электрических потенциалов ФС2 при непрерывном освещении

Как было показано в первом разделе настоящего обзора, а также на комплексах бактериальных реакционных центров и комплексах ФС1, при высушивании в стекловидной трегалозной матрице фотосинтетические реакционные центры (ФРЦ) переходят в состояние обратимого ангидробиоза и могут сохраняться долгое время при комнатной температуре (см. обзор [Möbius et al., 2021]). При этом светозависимый прямой перенос электрона замедляется, в первую очередь, на периферических участках ФРЦ. При регидратации функциональная активность ФРЦ полностью восстанавливалась. Однако ранее не было предпринято попыток исследовать протекторное действие высоких концентраций трегалозы на светозависимое образование $\Delta \psi$ при стационарном освещении.

Среди искусственных систем преобразования солнечной энергии большой интерес представляют гибридные фотобиоэлектрохимические элементы, основанные на взаимодействии ФС2 с электродом (см. обзоры [Musazade et al., 2018; Fang et al., 2019; Zhang, Reisner, 2020]). Уникальная способность ФС2 извлекать окислительно-восстановительные эквиваленты (электроны и протоны) из молекулы воды устраняет необходимость во внешних донорах электродом [Brinkert et al., 2016]. Кроме того, электрохимическая необратимость реакции окисления воды на границе раздела белок–электрод делает комплексы ФС2 предпочтительными при создании высокоэффективных преобразователей солнечной энергии на основе природных ФРЦ.

В нашей недавней работе была предпринята попытка зарегистрировать $\Delta \psi$ в ответ на постоянное освещение на ядерных комплексах ФС2 с активным КОВ, адсорбированных на нитроцеллюлозном пористом мембранном фильтре, помещенном между двумя полупроводниками стеклами из оксидов олова и индия (ITO) [Zaspa et al., 2020]. На рис. 3.4 (кривая *a*) показано, что в присутствии искусственного акцептора электрона 2,6-дихлорбензохинона при включении освещения наблюдается образование разности электрических потенциалов $\Delta \psi$,



Рис. 3.4. Генерация $\Delta \psi$ в ответ на постоянное освещение в комплексах ФС2, адсорбированных на нитроцеллюлозном пористом мембранном фильтре, помещенном между двумя полупроводниками стеклами из оксидов олова и индия (ITO). В присутствии (а) 100 мкМ 2,6-дихлоро-бензохинона; (б) 100 мкМ 2,6-дихлоро-бензохинона и 0,5 М трегалозы. Среда инкубации содержала 25 мМ Mes-NaOH (pH 6,5) буфер, содержащий 5 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ и 0,03 % додецилмальтозида. Стрелки (↑) и (↓) обозначают включение и выключение света, соответственно. (Рисунок взят из статьи [Zaspa et al., 2020])

которая не спадает в течение первых 15 с освещения, а затем начинает снижаться. При выключении света $\Delta \psi$ спадает до нуля. При добавлении трегалозы амплитуда светозависимой $\Delta \psi$ не снижается в течение 90 с освещения (рис. 3.4, кривая δ). Амплитуда фотоэлектрического ответа при повторных включениях света остается постоянной в течение 24 часов инкубации в темноте при комнатной температуре. Этот результат показывает, что концентрированный раствор трегалозы способствует более длительному поддержанию стационарной $\Delta \psi$ в исследуемой системе и предохраняет ФРЦ ФС2 от деградации при комнатной температуре.

4. Выводы и заключение

1. Высушивание в стекловидной трегалозной матрице приводит к переходу фотосинтетических реакционных центров Φ C2, лишенных Мп-кластера, в состояние обратимого ангидробиоза, при котором частично ингибируется прямой перенос электрона от тирозина Y_Z на фотоокисленный димер хлорофилла P_{680} . Φ C2 в таком состоянии может сохраняться при комнатной температуре в течение длительного времени (несколько месяцев), а при дегидратации прямой перенос электрона полностью восстанавливается.

2. При высоких концентрациях трегалозы увеличивается скорость светозависимого выделения кислорода ядерными комплексами ФС2 в растворе и протеолипосомах.

3. Трегалоза ускоряет электрогенный выброс протонов при переходах между S-состояниями комплекса окисления воды ФС2.

4. Высокие концентрации трегалозы способствуют стабильному поддержанию светозависимой $\Delta \psi$ при стационарном освещении и предохраняют интактную Φ C2 от деградации при комнатной температуре.

Совокупность имеющихся данных демонстрирует, что трегалоза является чрезвычайно эффективным биопротектором для ФС2 при комнатной температуре, способствует светозависимому образованию кислорода и может быть использована при создании высокоэффективных преобразователей солнечной энергии в электрическую форму.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Программы развития Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и в рамках государственного задания «Химико-физические механизмы взаимодействия интенсивного лазерного излучения с биологическими системами» (АААА-А19-119012990175-9).

Литература

- Мамедов М. Д., Бешта О. Е., Гуровская К. Н., Мамедова А. А., Неверов К. В., Самуилов В. Д., Семенов А. Ю. Фотоэлектрические ответы кислородвыделяющих комплексов фотосистемы II // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 606–611.
- Мамедов М. Д., Петрова И. О., Яныкин Д. В., Заспа А. А., Семенов А. Ю. Влияние трегалозы на выделение кислорода и переноса электрона в комплексах фотосистемы 2 // Биохимия. — 2015. — Т. 80. — С. 79–86.
- Петрова И. О., Курашов В. Н., Заспа А. А., Семенов А. Ю., Мамедов М. Д. Реакции векторного переноса зарядов на донорном участке лишенных марганца и реконструированных ядерных комплексов фотосистемы 2 // Биохимия. 2013. Т. 78. С. 513–521.
- Ahlbrink R., Haumann M., Cherepanov D., Bogershausen O., Mulkidjanian A., Junge W. Function of tyrosine Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor // Biochemistry. — 1998. — Vol. 37. — P. 1131–1142.
- Allison S., Chang B., Randolph T., Carpenter J. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding // Arch. Biochem. Biophys. — 1999. — Vol. 365. — P. 289–298.
- Argüelles J.-C., Guirao-Abad J. P., Sánchez-Fresneda R. Trehalose: A Crucial molecule in the physiology of fungi. Encyclopedia of Microbiology. — Fourth edition. — 2017. — P. 486–494.
- Barber J. Photosystem II: an enzyme of global significance // Biochem. Soc. Trans. 2006. Vol. 34. P. 619–631.
- Belton P. S., Gil A. M. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme // Biopolymers. 1994. Vol. 34. P. 957–961.
- Branca C., Magazu S., Maisano G., Migliardo P., Villari V., Sokolov A. P. The fragile character and structure-breaker role of alpha, alpha-trehalose: viscosity and Raman scattering findings // J. Phys. Condens. Matter. — 1999. — Vol. 11. — P. 3823–3832.
- Branca C., Maccarrone S., Magazu S., Maisano G., Bennington S. M., Taylor J. Tetrahedral order in homologous disaccharide-water mixtures // J. Chem. Phys. — 2005. — Vol. 122. — P. 174513.
- Brinkert K., Le Formal F., Li X., Durrant J., Rutherford A. W., Fantuzzi A. Photocurrents from photosystem II in a metal oxide hybrid system: Electron transfer pathways // Biochim. Biophys. Acta. — 2016. — Vol. 1857. — P. 1497–1505.
- Carpenter J. F., Crowe J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins // Biochemistry. 1989. Vol. 28. P. 3916–3922.
- Chen T., Fowler A., Toner M. Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture // Cryobiology. — 2000. — Vol. 40. — P. 277–282.
- Conjeaud H., Mathis P. The effect of pH on the reduction kinetics of P-680 in tris-treated chloroplasts // Biochim. Biophys. Acta. — Bioenergetics. — 1980. — Vol. 590. — P. 353–359.

- Cordone L., Cottone G., Giuffrida S., Palazzo G., Venturoli G., Viappiani C. Internal dynamics and protein-matrix coupling in trehalose-coated proteins // Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteomics. — 2005. — Vol. 1749. — P. 252–281.
- Cottone G., Giuffrida S., Bettati S., Bruno S., Campanini B., Marchetti M., Abbruzzetti S., Viappiani C., Cupane A., Mozzarelli A., Ronda L. More than a confinement: «soft» and «hard» enzyme entrapment modulates biological catalyst function // Catalysts. 2019. Vol. 9. P. 1024.
- Cox N., Pantazis D. A., Lubitz W. Current understanding of the mechanism of water oxidation in photosystem II and its relation to XFEL data // Annu. Rev. Biochem. — 2020. — Vol. 89. — P. 795–820.
- Elias M. E., Elias A. M. Trehalosebwater fragile system: properties and glass transition // J. Mol. Liq. 1999. Vol. 83. P. 303–310.
- Fang X., Sokol K. P., Heidary N., Kandiel T. A., Zhang J. Z., Reisner E. Structure activity relationships of hierarchical three-dimensional electrodes with photosystem II for semiartificial photosynthesis // Nano Lett. — 2019. — Vol. 19. — P. 1844–1850.
- Francia F., Palazzo G., Mallardi A., Cordone L., Venturoli G. Residual water modulates QA⁻to-QB electron transfer in bacterial reaction centers embedded in trehalose amorphous matrices // Biophys. J. — 2003. — Vol. 85. — P. 2760–2775.
- Francia F., Dezi M., Mallardi A., Palazzo G., Cordone L., Venturoli G. Protein-matrix coupling/uncoupling in «dry» systems of photosynthetic reaction center embedded in trehalose/sucrose: the origin of trehalose peculiarity // J. Am. Chem. Soc. — 2008. — Vol. 130 — P. 10240–10246.
- Francia F., Malferrari M., Sacquin-Mora S., Venturoli G. Charge recombination kinetics and protein dynamics in wild type and carotenoid-less bacterial reaction centers: studies in trehalose glasses // J. Phys. Chem. B. — 2009. — Vol. 113. — P. 10389–10398.
- Gerken S., Dekker J. P., Schlodder E., Witt H. T. Studies on the multiphasic charge recombination between chlorophyll a2⁺ (P-680⁺) and plastoquinone QA⁻ in photosystem II complexes, Ultraviolet difference spectrum of Chl-aII⁺/Chl-aII // Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — Vol. 977. — P. 52–61.
- Gopta O. A., Tyunyatkina A. A., Kurashov V. N., Semenov A. Y., Mamedov M. D. Effect of redox mediators on the flash-inuced membrane potential generation in Mn-depleted photosystem II core particles // Eur. Biophys. J. — 2008. — Vol. 37. — P. 1045–1050.
- Gorka M., Cherepanov D., Semenov A. Yu., Golbeck J. Control of electron transfer by protein dynamics in photosynthetic reaction centers // Critical Review Biochem. and Mol. Biology. — 2015. — Vol. 55. — P. 1–44.
- Greenspan L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions // J. Res. Natl. Bur. Stand. A. 1977. Vol. 814. P. 89–96.
- Haumann M., Mulkidjanian A., Junge W. Electrogenicity of Electron and Proton Transfer at the Oxidizing Side of Photosystem II // Biochemistry. — 1997. — Vol. 36. — P. 9304– 9315.
- Hillmann B., Schlodder E. Electron transfer reactions in Photosystem II core complexes from Synechococcus at low temeprature — difference spectrum of P₆₈₀⁺QA⁻ – P₆₈₀ QA at 77 K // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenergetics. — 1995. — Vol. 1231. — P. 76–88.

- Jain N. K., Roy I. Effect of trehalose on protein structure // Protein Sci. 2009. Vol. 18. P. 24–36.
- Kern J., Renger G. Photosystem II: structure and mechanism of the water: plastoquinone oxidoreductase // Photosynth. Res. — 2007. — Vol. 94. — P. 183–202.
- Kilburn D., Townrow S., Meunier V., Richardson R., Alam A., Ubbink J. Organization and mobility of water in amorphous and crystalline trehalose // Nat. Mater. — 2006. — Vol. 5. — P. 632–635.
- Kleinfeld D., Okamura M. Y., Feher G. Electron-transfer kinetics in photosynthetic reaction centers cooled to cryogenic temperatures in the charge-separated state: evidence for light-induced structural changes // Biochemistry. — 1984. — Vol. 23. — P. 5780–5786.
- Koochak H., Puthiyaveetil S., Mullendore D. L., Li M., Kirchhoff H. The structural and functional domains of plant thylakoid membranes // Plant J. — 2019. — Vol. 97. — P. 412– 429.
- Kurashov V., Gorka M., Milanovsky G. E., Johnson T. W., Cherepanov D. A., Semenov A. Y., Golbeck J. H. Critical evaluation of electron transfer kinetics in P₇₀₀-FA/FB, P₇₀₀-FX, and P₇₀₀-A1 Photosystem I core complexes in liquid and in trehalose glass // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenergetics. — 2018. — Vol. 1859. — P. 1288– 1301.
- Lerbret A., Bordat P., Affouard F., Guinet Y., Hedoux A., Paccou L., Prevost D., Descamps M. Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary Raman scattering experiments and molecular dynamics simulations // Carbohydr. Res. — 2005. — Vol. 340. — P. 881–887.
- Magazu S., Maisano G., Migliardo P., Tettamanti E., Villari V. Transport phenomena and anomalous glass-forming behaviour in a,a-trehalose aqueous solutions // Mol. Phys. — 1999. — Vol. 96. — P. 381–387.
- Malferrari M., Nalepa A., Venturoli G., Francia F., Lubitz W., Mobius K., Savitsky A. Structural and dynamical characteristics of trehalose and sucrose matrices at different hydration levels as probed by FTIR and high-field EPR // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2014. — Vol. 16. — P. 9831–9848.
- Malferrari M., Francia F., Venturoli G. Retardation of protein dynamics by trehalose in dehydrated systems of photosynthetic reaction centers. Insights from electron transfer and thermal denaturation kinetics // J. Phys. Chem. B. — 2015. — Vol. 119. — P. 13600– 13618.
- Malferrari M., Savitsky A., Lubitz W., Mobius K., Venturoli G. Protein immobilization capabilities of sucrose and trehalose glasses: the effect of protein/sugar concentration unraveled by high-field EPR // J. Phys. Chem. Lett. — 2016. — Vol. 7. — P. 4871–4877.
- Mamedov M. D., Kurashov V. N., Cherepanov D. A., Semenov A. Y. Photosysem II: where does the light-induced voltage come from? // Frontiers in Bioscience. — 2010. — Vol. 15. — P. 1007–1017.
- Mamedov M. D., Milanovsky G. E., Malferrari M., Vitukhnovskaya L. A., Francia F., Semenov A. Yu., Venturoli G. Trehalose matrix effects on electron transfer in Mn-depleted

protein-pigment complexes of Photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenergetics. – 2021. – Vol. 1862. – P. 148413.

- Milanovsky G., Gopta O., Petrova A., Mamedov M., Gorka M., Cherepanov D., Golbeck J. H., Semenov A. Multiple pathways of charge recombination revealed by the temperature dependence of electron transfer kinetics in cyanobacterial photosystem I // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenergetics. – 2019. – Vol. 1860. – P. 601–610.
- Möbius K., Savitsky A., Malferrari M., Francia F., Mamedov M. D., Semenov A. Yu., Lubitz W., Venturoli G. Soft Dynamic Confinement of Membrane Proteins by Dehydrated Trehalose Matrices — High-field EPR and Fast-laser Studies // Applied Magnetic Resonance. — 2021. — Vol. 51. — P. 773–850.
- Musazade E., Voloshin R., Brady N., Mondal J., Atashova S., Zharmukhamedov S. K., Huseynova I., Ramakrishna S., Najafpour M. M., Shen J. R., Bruce B. D., Allakhverdiev S. I. Biohybrid solar cells: fundamentals, progress, and challenges // J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev. — 2018. — Vol. 35. — P. 134–156.
- Najafpour M. M., Renger G., Hołyńska M., Moghaddam A. N., Aro E. M., Carpentier R., Nishihara H., Eaton-Rye J. J., Shen J. R., Allakhverdiev S. I. Manganese compounds as water oxidizing catalysts: From the natural water-oxidizing complex to nanosized manganese oxide structures // Chem. Rev. — 2016. — Vol. 116 — P. 2886–2936.
- Noguchi T., Sugiura M. Flash-induced FTIR difference spectra of the water-oxidizing complex in moderately hydrated photosystem II core films: Effect of hydration extent on S-state transitions // Biochemistry. — 2002. — Vol. 41. — P. 2322–2330.
- Palazzo G., Mallardi A., Hochkoeppler A., Cordone L., Venturoli G. Electron transfer kinetics in photosynthetic reaction centers embedded in trehalose glasses: trapping of conformational substates at room temperature // Biophys. J. — 2002. — Vol. 82. — P. 558–568.
- Sampedro J. G., Uribe S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity // Mol. Cell Biochem. — 2004. — Vol. 256– 257. — P. 319–327.
- Savitsky A., Malferrari M., Francia F., Venturoli G., Mobius K. Bacterial photosynthetic reaction centers in trehalose glasses: coupling between protein conformational dynamics and electron-transfer kinetics as studied by laser-flash and high-field EPR spectroscopies // J. Phys. Chem. B. — 2010. — Vol. 114. — P. 12729–12743.
- Schlodder E., Meyer B. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll aII (P-680) in Photosystem II particles from Synechococcus sp. // Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol. 890. — P. 23–31.
- Schlodder E., Cetin M., Lendzian F. Temperature dependence of the oxidation kinetics of TyrZ and TyrD in oxygen-evolving photosystem II complexes throughout the range from 320 K to 5 K // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenergetics. — 2015. — Vol. 1847. — P. 1283–1296.
- Semenov A., Cherepanov D., Mamedov M. Electrogenic reactions and dielectric properties of photosystem II // Photosynt. Res. — 2008. — Vol. 98. — P. 121–130.
- Shelaev I., Gorka M., Savitsky A., Kurashov V., Mamedov M., Gostev F., Moebius K., Nadtochenko V., Golbeck J., Semenov A. Zeirscrift fur physikalische chemie-

international journal of research in physical chemistry and chemical physics. — Germany: Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2016. — P. 230.

- Shevela D., Messinger J. Probing the turnover efficiency of photosystem II membrane fragments with different electron acceptors // Biochim. Biophys. Acta. — 2012. — Vol. 1817. — P. 1208–1212.
- Shoji M., Isobe H., Yamanak S. et al. Theoretical insight in to hydrogen-bonding networks and proton wire for the CaMn₄O₅ cluster of photosystem II. Elongation of Mn-Mn distances with hydrogen bonds // Catal. Sci. Technol. 2013. Vol. 3. P. 1831–1848.
- Shutova T., Klimov V. V., Andersson B., Samuelsson G. A. Cluster of carboxylic groups in PsbO protein is involved in proton transfer from the water oxidizing complex of photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. — Bioenergetics. — 2007. — Vol. 1767. — P. 434–440.
- Suga M., Akita F., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Nakajima Y., Shimizu T., Yamashita K., Yamamoto M., Ago H., Shen J.-R. Native structure of photosystem II at 1,95 a resolution viewed by femtosecond X-ray pulses // Nature. — 2015. — Vol. 517. — P. 99–103.
- Sussich F., Cesaro A. Trehalose amorphization and recrystallization // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343. P. 2667–2674.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1,9 Å // Nature. — 2011. — Vol. 473. — P. 55–65.
- Vinyard D. J., Brudvig G. W. Progress toward a molecular mechanism of water oxidation in photosystem II // Annu. Rev. Phys .Chem. — 2017. — Vol. 68. — P. 101–116.
- Wang G. M., Haymet A. D. J. Trehalose and other sugar solutions at low temperature: modulated differential scanning calorimetry (MDSC) // J. Phys. Chem. B. — 1998. — Vol. 102. — P. 5341–5347.
- Wei X., Su X., Cao P., Liu X., Chang W., Li M., Zhang X., Liu Z. Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3,2 Å resolution // Nature. — 2016. — Vol. 534. — P. 69–74.
- Williams W. P., Gounaris K. Stabilization of PSII mediated electron transport in oxygenevolving PSII core preparations by the addition of compatible co-solutes // Biochim. Biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1100. — P. 92–97.
- Xu Q., Gunner M. R. Trapping conformational intermediate states in the reaction center protein from photosynthetic bacteria // Biochemistry. — 2001. — Vol. 40. — P. 3232–3241.
- Zaharieva I., Dau H. Energetics and kinetics of S-state transitions monitored by delayed chlorophyll fluorescence // Frontiers Plant Sci. — 2019. — Vol. 10. — DOI: 10.3389/fpls.2019.00386.
- Zaspa A. A., Vitukhnovskaya L. A., Mamedova A. M., Semenov A. Yu., Mamedov M. D. Photovoltage generation by photosystem II core complexes immobilized onto a Millipore filter on an indium tin oxide electrode // J. Bioenerg. Biomembr. — 2020. — Vol. 52. — P. 495–504.
- Zhang J. Z., Reisner E. Advancing photosystem II photoelectrochemistry for semi-artificial photosynthesis // Nature Rev. Chem. 2020. Vol. 4. P. 6–21.

Effect of trehalose on charge transfer in photosystem II complexes

M. D. Mamedov¹, L. A. Vitukhnovskaya^{1,2}, G. E. Milanovsky¹, A. Yu. Semenov^{1,2*}

 ¹A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia
²Semenov Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia
*E-mail: semenov@genebee.msu.ru

This review describes the effect of disaccharide trehalose, unique in its physicochemical characteristics, on isolated core complexes of photosystem II (PSII) at room temperature. It was shown that when dried in a glassy trehalose matrix, the PSII complex can be preserved for several months, although there is a partial inhibition of electron transfer from the redox-active tyrosine Y_Z to the photooxidized primary electron donor P_{680} . With rehydration, direct electron transfer is completely restored.

The review also presents results indicating the stimulating effect of trehalose on both the stationary rate of light-dependent oxygen evolution and on the proton emission reaction during S-transitions of the water oxidation complex in PSII. An important part of the review is devoted to describing the data on the stabilizing effect of this bioprotector on the generation of the electric potentials difference under long-term constant illumination in a semi-synthetic system based on PSII complexes immobilized on a membrane filter sandwiched between two semi-conductor electrodes.

The described results allow us to conclude that trehalose is an extremely effective bioprotector and can be used to create highly efficient converters of solar energy into electrical form.

Keywords: photosystem II, trehalose, glassy matrix, bioprotectors, light-dependent oxygen evolution, water oxidation complex, electrical potential difference.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ КАТИОНОВ ЖЕЛЕЗА И ЗАМЕЩЕНИЕ ИМИ КАТИОНОВ МАРГАНЦА В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ЦЕНТРЕ КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2

Л. Н. Давлетшина, А. В. Локтюшкин, Е. Р. Ловягина, Б. К. Сёмин¹

Фотосистема 2 (ФС2) фотосинтетического аппарата оксигенных организмов содержит каталитический центр, осуществляющий одну из важнейших биоэнергетических реакций — светозависимое окисление воды до молекулярного кислорода. Каталитический центр состоит из 4 катионов марганца и 1 катиона кальция, связанных между собой кислородными мостиками — Мп₄CaO₅. При исследовании взаимодействия катионов Fe(II) с донорной стороной мембранных препаратов ФС2 без кислородвыделяющего комплекса (КВК) авторами статьи было обнаружено высокоэффективное и специфическое связывание их с Мп-связывающими участками, что представляет собой уникальное явление. В представленной работе дан краткий обзор исследований авторов возможности замещения катионов марганца катионами железа в КВК нативных препаратов ФС2 и эффектов, наблюдаемых при этом процессе. В частности, охарактеризованы параметры связывания катионов Fe(II) с Мп-связывающими участками в ФС2 без КВК и замещения катионов Mn катионами железа в нативном КВК. Обсуждается устойчивость катионов марганца в КВК ФС2 к действию восстановителей, в том числе катионов Fe(II), при различных pH. Отдельно обсуждается структурный переход в марганцевом кластере в области pH = 5,7, сопровождающийся изменением редокс-потенциала катиона(ов) марганца и повышением устойчивости Mn-кластера к действию восстановителей. Предполагается, что структурный переход в Мп-кластере в области рН 5,7 вовлечен в механизм защиты ФС2 от фотоингибирования. Специальный раздел посвящен формированию при pH = 5,7 уникального кластера Mn_3Fe_1 в KBK Φ C2. Мембранные препараты ФС2 с таким химерным кластером способны в присутствии экзогенных катионов кальция выделять кислород при освещении (около 25 % скорости в нативной ФС2). Конкурентное взаимодействие катионов марганца и железа с Мпсвязывающими участками в ФС2 без КВК, по сути имитирующей первичную фотосистему, обсуждается в эволюционном аспекте.

Ключевые слова: фотосистема 2, кислородвыделяющий комплекс, марганец, железо, кальций, высокоаффинный Mn-связывающий участок, фотоингибирование.

¹ Кафедра биофизики, биологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия.

Введение

Оксигенные организмы (к ним относятся высшие растения, водоросли и цианобактерии) осуществляют важнейший светозависимый биологический процесс, обеспечивающий жизнь на Земле и называемый фотосинтезом. Главными компонентами фотосинтетического аппарата являются фотосистема 2 (ФС2) и фотосистема 1 (ФС1). ФС2 содержит уникальный каталитический центр, обеспечивающий окисление молекул воды, которые являются донорами протонов и электронов, необходимых для восстановления НАДФ⁺ и синтеза АТФ. Образующийся при этом молекулярный кислород выбрасывается в атмосферу как побочный продукт. Эта реакция является практически единственным источником O_2 на нашей планете.

Каталитический центр, окисляющий воду, состоит из 4 катионов марганца и 1 катиона кальция, связанных между собой кислородными мостиками — Mn₄CaO₅. Структурная организация марганцевого кластера была определена с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,9 Å в 2011 году [Umena et al., 2011]. Полученная атомная структура кислородвыделяющего комплекса (KBK) ФС2 приведена на рис. 1. Она представляет собой неправильный куб, сформированный тремя катионами марганца, катионом кальция и четырьмя атомами кислорода. Четвертый катион марганца расположен на некотором



Рис. 1. Атомная структура КВК ФС2. Са, Мп(1–4) и О(1–5) — ионы кальция, марганца и атомы кислорода. W(1–4) — атомы кислорода молекул воды, являющихся лигандами ионов Mn4 и кальция. Структура получена в работе [Umena et al., 2011]. Код PDB: 3WU2

удалении от куба, но соединен с ним. Отдельно расположенный катион марганца (Mn4, см. рис. 1) и катион кальция имеют по 2 молекулы воды в качестве лигандов. Являются ли эти молекулы воды субстратной водой, пока неясно.

Критикуемым недостатком работы Umena с соавторами [Umena et al., 2011] была возможность восстановления рентгеновскими лучами катионов марганца в процессе эксперимента, что могло повлиять на точность определения расстояний между элементами кластера. Этот возможный артефакт был исключен позже с применением другого метода — лазера, генерирующего фемтосекундные импульсы X-лучей [Suga et al., 2015]. Однако, несмотря на то, что структура Mn₄CaO₅-кластера в настоящее время известна, механизм окисления им молекул воды и синтеза молекулярного кислорода все еще остается непонятным.

При исследовании роли и механизма функционирования катионов металлов в ферментах часто используется метод замещения нативного катиона другими катионами металлов с целью выяснения вопроса — какие особенности нативного катиона металла важны для осуществления его специальной функции. В случае Φ C2 были исследованы возможности замещения катионов Mn катионами таких металлов, как Zn²⁺, Co²⁺ [Ghirardi et al., 1996]. Однако эффективность их связывания с Mn-связывающими участками в Φ C2 без KBK [Φ C2(-Mn)] была мала. В наших первоначальных работах [Semin et al., 1995, 2002] мы исследовали взаимодействие катионов Fe(II) с донорной стороной мембранных препаратов Φ C2(-Mn) и обнаружили высокоэффективное и специфическое связывание их с Mn-связывающими участками, что является уникальным явлением. В данной работе мы даем краткий обзор наших исследований возможности замещения катионов марганца катионами железа в KBK нативных препаратов Φ C2 и эффектов, наблюдаемых при этом процессе.

1. Связывание катионов Fe(II) с Mn-связывающими участками в ФС2 без кислородвыделяющего комплекса

Катионы марганца могут быть экстрагированы из КВК ФС2 гидроксиламином или Трисом при щелочных pH. Обработка этими соединениями приводит к восстановлению катионов марганца, и восстановленные катионы покидают участок связывания. Было установлено, что препараты ФС2 без КВК содержат только один участок связывания экзогенных катионов марганца — высокоаффинный Mn-связывающий участок [Ono, Mino, 1999]. Используя метод измерения скорости электронного транспорта в таких препаратах от экзогенного донора электронов дифенилкарбазида в присутствии катионов Fe(II) или Mn(II), мы обнаружили, что катионы Fe(II) связываются с высокоаффинным участком с высокой эффективностью, сопоставимой с эффективностью связывания катионов марганца (1–2 мкМ) [Semin et al., 1995]. Так же как и в случае катионов марганца, для связывания катионов железа необходим свет, обеспечивающий их окисление. В последующей работе [Semin et al., 2002] мы подтвердили эти результаты, используя метод регистрации кинетики затухания флуоресценции в ответ на вспышку света. В этой же работе мы показали, что окисленные катионы железа, связываясь с высокоаффинным участком с большой эффективностью, препятствуют связыванию с этим участком катионов марганца — т. е. его блокируют. Кинетические исследования показали, что в блокировании участвует не один катион железа, а два или больше [Semin et al., 1995, 2002]. При измерении концентрации катионов железа в буфере в процессе блокирования было установлено, что для осуществления блокирования необходимо окисление 5 катионов железа [Semin, Seibert, 2004]. В связывании катиона железа с высокоаффинным участком принимает участие карбоксильная группа аминокислоты, связывающая на этом участке и катион марганца — D1-Asp170 [Semin, Seibert, 2006а]. В этой связи следует отметить, что С-концевые участки полипептидов D1 и D2 реакционного центра содержат консервативные районы, способные с одинаковой эффективностью связывать димеры железа и марганца в таких белках, как рибонуклеотидредуктаза, метанмонооксигеназа [Semin, Parak, 1997]. Процесс блокирования высокоаффинного участка катионами железа по ряду параметров соответствует процессу фотоактивации (реконструкции марганцевого кластера). Действительно, как и в случае фотоактивации, для блокирования необходим либо свет слабой интенсивности, либо темновой интервал между вспышками света (при импульсном освещении) [Semin, Seibert, 2006b]. Окисление катионов железа при освещении осуществляется в процессе разделения зарядов и слабого электронного транспорта к акцептору электронов возможно, молекулярному кислороду [Lovyagina et al., 2005].

Частицы Φ C2(-Mn) со встроенными катионами железа Fe(III) не обладают какой-либо активностью: они не выделяют кислород при освещении, и в них не регистрируется электронный транспорт. Однако наблюдаются изменения в характеристиках переноса электронов на уровне переносчика Y_Z, связанные с реконструкцией водородной связи между Y_Z и D1-His190, нарушенной при экстракции марганца [Semin et al., 2005]. На основании полученных результатов было предположено, что в нативных препаратах Φ C2 между этими аминокислотами существует низкобарьерная водородная связь [Semin et al., 2005], что было подтверждено позднее в работе с использованием рентгеноструктурного анализа [Saito et al., 2011].

Возможное конкурентное взаимодействие катионов марганца и железа в процессе эволюционного формирования ФС2

Характер конкурентного взаимодействия катионов Mn(II) и Fe(II) с донорной стороной ФС2(-Mn) может быть актуален для детализации эволюционной теории развития современного кислородвыделяющего комплекса ФС2 высших растений и водорослей. Протофотосистема формировалась более 2,5 млрд лет назад в Архейском океане, где помимо Mn(II) присутствовали также катионы Fe(II) в концентрации, сравнимой с концентрацией Mn(II). Одна из предложенных в последние годы теорий ранней эволюции фотосинтеза предполагает, что первичным донором электронов для протофотосистемы были катионы Mn(II), а не молекулы воды [Johnson et al., 2013]. Позже Chernev с соавторами опубликовали дополнительные доказательства, поддерживающие эту гипотезу [Chernev et al., 2020]. Они показали, что светозависимое окисление катионов Mn(II) ФС2(-Mn) сопровождается образованием наночастиц окиси Mn(III,IV) типа бернессита, которые могли быть прототипом марганцевого кластера современной ФС2. Поскольку донорная сторона первичной фотосистемы не была защищена периферическими белками, реакция окисления катионов Mn(II) могла быть чувствительна к факторам окружающей среды, в частности к присутствию значительной концентрации Fe(II). Мы исследовали конкурентное взаимодействие катионов Mn(II) и Fe(II) с Mn-связывающими участками в ФС2(-Mn), имитирующей протофотосистему, с использованием фотометрии и метода измерения кривых индукции флуоресценции хлорофилла. При одинаковой концентрации этих катионов в условиях низкой освещенности имеет место конкуренция за место связывания, проявляющаяся в частичном ингибировании окисления Mn(II). Если концентрация катионов Fe(II) в 4 и более раз превышает концентрацию Mn(II), высокоаффинный Mn-связывающий участок блокируется ионами Fe, и окисление катионов Mn(II) полностью прекращается. При световой экспозиции 5-10 мин катионы Fe(II) эффективно предотвращают светозависимое связывание Mn(II) с высокоаффинным участком и его окисление [Lovyagina, Semin, 2022].

2. Взаимодействие катионов железа с ФС2, содержащей марганцевый кластер. Замещение катионов марганца в КВК катионами железа

В нативных препаратах Φ C2 марганцевый кластер защищен периферическими белками (PsbO, PsbP и PsbQ в высших растениях) и недоступен для восстановителей достаточно большого размера типа гидрохинона, а также восстановителей, имеющих заряд, типа катионов Fe(II) [Ghanotakis et al., 1984]. При удалении белков PsbP и PsbQ (удаляется также Ca²⁺ из KBK) катионы марганца становятся доступными для этих редуктантов и могут быть восстанавлены ими. Учитывая тот факт, что катионы Fe(II) после окисления прочно связываются с Mn-связывающими участками, а также высокую эффективность катионов Fe(II) как восстановителей, мы изучили их влияние на марганцевый кластер в препаратах Φ C2 без двух периферических белков и катиона кальция в KBK [Φ C2(-Ca)]. В проведенном исследовании [Semin, Seibert, 2016] мы обнаружили, что: (1) катионы Fe(II) удаляют из мембранных препаратов Φ C2(-Ca) 2 из 4 катионов марганца вследствие их восстановления катионами железа; (2) восстановление катионов марганца сопровождается окислением катионов железа; (3) образующиеся катионы Fe(III) связываются с освобожденными Mn-связывающими участками; (4) один из катионов железа оккупирует высокоаффинный Mn-связывающий участок; (5) образовавшийся химерный кластер Mn₂Fe₂ в состоянии окислять воду, но с меньшей скоростью, чем нативные препараты, и не до молекулярного кислорода, а до перекиси водорода [Semin et al., 2013].

3. Влияние рН на функциональную активность фотосистемы 2

Скорость генерации О2 кислородвыделяющим комплексом ФС2 в оксигенных фотосинтезирующих организмах значительно зависит от pH окружающей среды. Зависимость кислородвыделяющей активности мембранных препаратов ФС2 имеет колоколообразную форму с максимумом в области pH = 6,0-7,0 и ниспадающими участками с 50 %-ным ингибированием в области pH = 4,8-5,5 и 7,4-8,0 [Damoder, Dismukes, 1984; Schlodder, Meyer, 1987; Vass, Styring, 1991; Haddy et al., 1999; Schiller, Dau, 2000; Semin et al., 2004]. Механизм pHзависимой инактивации ФС2 до сих пор недостаточно ясен. Ингибирование КВК в щелочной области, по крайней мере частично, определяется экстракцией аниона Cl⁻ из KBK [Schiller, Dau, 2000]. В области кислых pH инактивация KBK в значительной степени определяется потерей периферических белков PsbP, PsbQ и PsbO. Периферические белки PsbP, PsbQ и PsbO имеют соответствующие pK (50 %-ная диссоциация) — 5,0, 4,1 и 3,6 [Shen, Inoue, 1991]. pH-зависимая диссоциация PsbP и PsbQ белков сопровождается экстракцией катиона Ca²⁺ из КВК, что приводит к ингибированию реакции окисления воды [Ono, Inoue, 1988]. Увеличение концентрации протонов в среде оказывает влияние и на марганцевый кластер КВК, в том числе и на S-переходы каталитического цикла. В работах Bernát с соавторами и Suzuki с соавторами практически идентичные результаты были получены на препаратах ФС2, выделенных из шпината [Bernát et al., 2002] и термофильных цианобактерий Thermosynechoccocus elongatus [Suzuki et al., 2005]. В проведенных экспериментах было установлено, что в КВК шпината переход $S_1 \rightarrow S_2$ не зависит от pH в области 4,1-8,4, тогда как переходы $S_2 \rightarrow S_3, S_3 \rightarrow [S_4] \rightarrow S_0$ и $S_0 \rightarrow S_1$ имеют pK, соответственно, 4,0, 4,5 и 4,7 [Bernát et al., 2002].

Устойчивость катионов марганца в кислородвыделяющем комплексе ФС2 к действию восстановителей при различных pH

Известно, что экзогенные восстановители с небольшим размером молекулы, такие как гидроксиламин, гидразин, перекись водорода, могут восстанавливать катионы марганца в КВК нативной Φ C2 [Ghanotakis et al., 1984]. Восстановители большего размера, такие как гидрохинон и бензидин, также могут восстанавливать катионы марганца, но в препаратах Φ C2, в которых марганцевый кластер не закрыт периферическими белками PsbP и PsbQ [Ghanotakis et al., 1984]. Такой тип препаратов получают обработкой Φ C2 раствором NaCl с высокой концентрацией (2 M), в результате чего Φ C2 теряет два периферических белка PsbP и PsbQ и катион кальция из КВК [Ono, Inoue, 1990]. Восстановленные экзогенными восстановителями катионы марганца Mn(II) покидают участки связывания. Эта реакция часто используется как метод экстракции катионов марганца из КВК Φ C2 (например, экстракция марганца гидроксиламином или Трисом при щелочных pH). Следует отметить, что обработка гидроксиламином не удаляет из Φ C2 периферический марганецстабилизирующий белок PsbO, тогда как экстракция марганца обработкой Трисом удаляет все 3 периферических белка [Klimov et al., 1982; Ghirardi et al., 1996; Allakhverdiev et al., 1997; Nagata et al., 2008].

Действие восстановителей на катионы марганца в КВК имеет две особенности. Первая: эффективность восстановления катионов Мп зависит от природы восстановителя. Например, при pH = 6.5 гидроксиламин экстрагирует все 4 катиона, тогда как гидрохинон экстрагирует только 3 катиона марганца из 4, а катионы железа экстрагируют только 2 катиона марганца. Вторая: эффективность экстракции зависит от рН. Например, катионы Fe(II) экстрагируют 2 катиона Mn(II) при pH = 6,5 и только один при pH = 5,7. Соответственно, гидрохинон и перекись водорода экстрагируют 3 и 2 катиона при тех же рН (таблица 1). Таким образом, рН-зависимая устойчивость к действию экзогенных восстановителей имеется, предположительно, только у одного катиона марганца, входящего в состав марганцевого кластера КВК. Поскольку экстракция катионов марганца происходит в результате их восстановления, полученные результаты свидетельствуют о важной роли соотношения окислительно-восстановительных потенциалов восстановителя и катионов марганца в этом процессе [Kunzleman et al., 2004]. В этой связи можно предположить, что повышение устойчивости к действию восстановителей одного из катионов марганца в кластере связано с уменьшением его редокс-потенциала при понижении рН.

Окисление двух молекул воды, сопряженное с образованием молекулярного кислорода, осуществляется каталитическим центром, в состав которого входит помимо 4 катионов марганца также катион кальция. Катион Ca^{2+} соединен с катионами Mn1, 2, 3 и 4 кислородными мостиками O1, O2 и O5 (см. рис. 1). Механизм участия Ca^{2+} в реакции фотолиза воды в деталях пока неизвестен. Согласно одной из гипотез катион кальция связывает молекулу субстратной воды. Действительно, рентгеноструктурный анализ показал, что Ca^{2+} связывает две молекулы воды (W3 и W4, см. рис. 1). Имеются экспериментальные данные, свиде-

тельствующие, что кислород одной из них (W3), возможно, принимает участие в образовании молекулярного кислорода [Kim, Debus, 2017]. В последнее время появилась новая гипотеза, основанная на модельных экспериментах. Tsui и Agapie [2013] обнаружили линейную зависимость между окислительно-восстановительным потенциалом гетерометаллического металл-оксидного кластера и кислотностью Льюиса редокс неактивного катиона металла. Авторы предположили, что эта корреляция является свидетельством участия катиона кальция в модулировании редокс-потенциала марганцевого кластера. Таким образом, катион кальция в КВК может влиять на редокс потенциал одного или нескольких катионов марганца и регулировать эффективность восстановления катионов марганца экзогенными редокс-агентами. В этой связи мы исследовали влияние катионов Ca²⁺ на эффективность экстракции катионов марганца гидрохиноном и катионами Fe(II). Полученные результаты представлены в таблице 2 и свидетельствуют о влиянии катиона Ca²⁺ на восстановление катионов марганца в КВК. Инкубация препарата ФС2(-Са) в присутствии Са²⁺ с гидрохиноном предотвращает экстракцию 1 катиона марганца при рН 6,5, но не влияет на процесс экстракции при рН = 5,7 (таблица 2). В случае другого восстановителя, а именно катиона Fe(II), Ca²⁺ ингибирует экстракцию дополнительного катиона Мп как при pH 5,7, так и при pH = 6,5 (таблица 2). Ингибирующее действие Ca^{2+} на экстракцию катионов марганца из КВК гидрохиноном и катионами железа подтверждает возможность влияния катиона Ca²⁺ на редокс-потенциал одного или нескольких катионов марганца в КВК.

Восстановитель	Количество катионов Mn на реакционный центр ФС2 после обра-		
	ботки восстановителем		
	pH = 6,5	pH = 5,7	
Без обработки	$4,0 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$	
Гидроксиламин	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	
Гидрохинон	$1,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	
H ₂ O ₂	$1,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	
Fe(II)	2.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2	

Таблица 1. Эффективность экстракции катионов марганца из кислородвыделяющего комплекса различными восстановителями в зависимости от pH

Представленные выше результаты позволяют предположить, что в области pH 5,7 происходит протонирование либо кислородного мостика/мостиков, либо одной или нескольких аминокислотных групп, входящих в состав марганцевого кластера или его ближайшего окружения. Этот процесс сопровождается снижением кислородвыделяющей активности до 50–65 % [Schiller, Dau, 2000; Semin et al., 2015] и уменьшением редокс-потенциала одного из катионов марганца, что делает его недоступным для восстановителя. Возможно, в pH-зависимость действия восстановителя вносит свой вклад и процесс протонирования/депротонирования самого восстановителя, как, например, в случае гидрохинона, однако влияние катионов железа свидетельствует, что pH-зависимость определяется главным образом процессом протонирования/депротонирования КВК. Следует отметить, что pH-зависимость кислородвыделяющей активности мембранных препаратов как шпината, так и цианобактерий, измеренная достаточно детально с шагом 0,1 pH, имеет небольшое плечо в области pH 5,7 [Schiller, Dau, 2000]. Более заметное плечо в pH-зависимости функциональной активности ФС2 в области pH = 5,3 появляется в мутантах D1-S169A и D2-K317A [Ghosh et al., 2019].

Таблица 2. Эффективность экстракции катионов марганца из КВК гидрохиноном и ионами Fe(II) в присутствии катионов Ca²⁺ при различных pH

Пистоног	Количество катионов Mn на реакционный центр ФС2		
Препарат	после обработки восстановителем		
	pH = 6,5	pH = 5,7	
$\Phi C2(-Ca)^{a, 6}$	$4,0 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$	
$\Phi C2(-Ca) + H_2Q^a$	$1,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	
$\Phi C2(-Ca) + H_2Q + Ca^{2+a}$	$1,8 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	
$\Phi C2(-Ca) + Fe(II)^{6}$	$2,0 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,2$	
Φ C2(-Ca) + Fe(II) + Ca ²⁺⁶	$3,1 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,2$	

^а По данным [Semin et al., 2015].

⁶По данным [Semin et al., 2021].

4. Формирование кластера Mn₃Fe₁ в КВК ФС2 при рН 5,7

Взаимодействие катионов железа как восстановителя с катионами марганца в КВК имеет некоторые особенности. Во-первых, взаимодействие возможно только в препаратах Φ C2 без периферических белков PsbQ и PsbP, закрывающих марганцевый кластер в КВК и делающих его недоступным для катионов Fe(II). Во-вторых, катионы Fe(III) с высокой специфичностью и эффективностью связываются с Mn-связывающими участками КВК, в том числе и с высокоаффинным Mn-связывающим участком [Semin et al., 1995, 2002; Semin, Seibert, 2006]. Эта особенность окисленных катионов железа приводит к тому, что при восстановлении катиона марганца катионом Fe(II) катионы Mn(II) высвобождаются из участка связывания, и освобожденный Mn-связывающий участок с высокой эффективностью связывает катион Fe(III). Этот процесс был исследован в случае взаимодействия катионов Fe(II) с марганцевым кластером КВК при pH = 6,5 [Semin, Seibert, 2016], и было установлено, что катионы железа замещают два катиона марганца, один из которых связан с высокоаффинным Mn-

связывающим участком. Химерный кластер окисляет на свету молекулы воды с меньшей эффективностью, чем нативные препараты ФС2, но не до молекулярного кислорода, а до перекиси водорода. Как отмечалось выше (таблица 2), при pH = 5,7 катионы железа экстрагируют из КВК не два катиона марганца, а один. Экстракция, по-видимому, также сопровождается замещением катиона марганца на катион железа, т. е. в КВК образуется кластер Mn₃Fe₁. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что гидрохинон не экстрагирует катионы марганца из химерного кластера Mn₃Fe₁, но экстрагирует три катиона марганца из нативного кластера Mn₄ [Semin et al., 2018], т. е. в химерном кластере катионы марганца более устойчивы к действию восстановителя. Это косвенно свидетельствует о том, что кластер содержит катион железа, повышающий устойчивость катионов марганца. Данный вывод подтверждается тем, что в случае химерного кластера Mn₂Fe₂ при сравнении с кластером Mn₂ наблюдается такой же эффект [Semin et al., 2018]. При исследовании функциональных свойств ФС2 с химерным кластером Mn₃Fe₁ был обнаружен интересный факт. В отличие от ФС2 с химерным кластером Mn₂Fe₂ ФС2 с кластером Mn₃Fe₁ выделяет на свету в присутствии экзогенного кальция кислород. Эффективность кислородвыделяющей реакции составляет 27 % аналогичной скорости в нативной ФС2. Возможность окисления воды химерным кластером с выделением кислорода представляет интерес для исследования механизма фотосинтетического окисления воды (идентификация катионов марганца, играющих генеральную роль в фотолизе воды и т. д.), а также для разработки искусственных систем фотолиза воды как генераторов молекулярного кислорода и водорода.

5. Влияние рН на процесс фотоингибирования фотосистемы 2

Известно, что ФС2 разрушается под действием света. Данный эффект называется фотоингибированием, и имеется достаточно много данных, указывающих на то, что первой стадией этого процесса является деструкция марганцевого кластера Mn₄CaO₅ в KBK [Virgin et al., 1988; Hakala et al., 2005; Tyystjärvi, 2008; Zavafer et al., 2015]. Марганцевый кластер может быть разрушен восстановителями, например, некоторыми активными формами кислорода (O_2^- , H_2O_2), генерируемыми на донорной и акцепторной стороне ФС2 [Pospišil, 2012]. Таким образом, повышенная устойчивость марганцевого кластера к действию восстановителей (гидрохинон, перекись водорода, катионы Fe(II)) при pH 5,7, обнаруженная нами [Semin et al., 2015, 2018], может обеспечить и повышенную устойчивость ФС2 к фотоингибированию при этих pH. В изложенных ниже экспериментах мы провели сравнительное исследование кинетик фотоингибирования мембранных препаратов ФС2 из шпината при pH = 5,7 и 6,5. Эффективность фотоингибирования определяли, измеряя скорость выделения кислорода и восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) после освещения в течение определенного времени (рис. 2). Мы обнаружили, что эффективность фотоингибирования электронного транспорта в ФС2 больше при pH 6,5, чем при pH = 5,7. Время 50 %-го ингибирования составляет 7,8 \pm 0,4 и 18,0 \pm 0,6 мин при pH = 6,5 и 5,7, соответственно. Таким образом, при pH = 5,7 наблюдается эффект повышенной защиты от фотоингибирования, и этот эффект является максимальным по величине именно при этом pH, судя по его pH-зависимости.



Рис. 2. Влияние pH на фотоинактивацию реакций выделения кислорода (a) и восстановления ДХФИФ (б) нативными препаратами ФС2 по данным работы [Davletshina, Semin, 2020]. Мембранные препараты ФС2 (15 мкг Хл/мл) суспендировали в буфере A, pH = 6,5 (синие кривые) или pH = 5,7 (красные кривые) и освещали при 25 °C белым светом (1300 мк $\Im \cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$) при постоянном перемешивании в отсутствие искусственного акцептора. После освещения в течение определенного времени измеряли скорость выделения O₂ при 25 °C в присутствии акцептора 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (0,2 мМ) или скорость восстановления ДХФИФ (начальная концентрация 40 мкМ). Контрольные скорости выделения O₂ при pH 6,5 и 5,7 составляли 450 ± 16 и 330 ± 15 мкмоль O₂·мг Хл⁻¹·ч⁻¹, соответственно. Контрольные скорости восстановления ДХФИФ при pH = 6,5 и 5,7 составляли 130 ± 9 и 97 ± 5 мкмоль ДХФИФ·мг Хл⁻¹·ч⁻¹, соответственно. Состав буфера A: сахароза 400 мМ, MES 50 мМ, NaCl 15 мМ

Экстракция катиона кальция из КВК не оказывает влияния на pH-эффект и на скорость фотоингибирования. Однако препараты ФС2, из которых был полностью экстрагирован КВК (катионы марганца и кальция), показали совсем другую кинетику фотоингибирования (рис. 3).

Полученные результаты демонстрируют, что скорость фотоингибирования в препаратах ФС2(-Mn) значительно больше, чем в нативных препаратах ФС2



Рис. 3. Влияние pH на фотоинактивацию транспорта электрона в мембранных препаратах Φ C2(-Mn) по данным работы [Davletshina, Semin, 2020]. Мембранные препараты Φ C2(-Mn) (15 мкг Хл/мл) были суспендированы в буфере A, pH = 6,5 (синяя кривая) или pH = 5,7 (красная кривая) и освещены при 25 °C белым светом (1300 мкЭ·м⁻²·c⁻¹) при постоянном перемешивании в отсутствие искусственных акцептора и донора. После освещения в течение определенного времени измеряли скорость восстановления ДХФИФ при 25 °C в присутствии донорной системы [3 мМ H₂O₂ + 2 мкМ MnCl₂]. Контрольные значения скорости восстановления ДХФИФ составляли 149 ± 10 и 71 ± 8 мкмоль ДХФИФ·мг Хл⁻¹·ч⁻¹ при pH = 6,5 и 5,7, соответственно

 $(t_{1/2} = 0,18 \pm 0,01$ мин при pH = 6,5, тогда как в нативных препаратах $t_{1/2} = 7,8 \pm 0,4$ мин). Увеличение скорости фотоингибирования ФС2, не содержащей марганец, известно [Klimov et al., 1990]. Повышенная чувствительность к свету объясняется окислительным повреждением реакционного центра, так как время жизни первичных окисленных доноров P_{680}^+ и Y_Z^+ значительно увеличивается в отсутствие притока электронов от марганцевого кластера/воды. Но здесь важно отметить новый полученный факт — pH не влияет на скорость фотоинактивации ФС2 без марганца (рис. 3). Этот результат ясно демонстрирует, что pH-зависимость фотоинактивации определяется pH-зависимым структурным переходом в KBK ФС2.

рН-зависимость фотоингибирования ФС2 в тилакоидных мембранах

Наш анализ pH-зависимости фотоинактивации ФС2 показывает, что наибольшая устойчивость к этому процессу наблюдается в области pH 5,7. Эта величина pH представляет существенный интерес, поскольку pH = 5,7 — это pH внутритилакоидной среды (люмена) при освещении. Известно, что генерируемый светом электронный транспорт в ФС2 обеспечивает появление трансмембранного протонного градиента ΔpH , используемого АТФ синтазой для синтеза АТФ. Появление ΔpH сопровождается уменьшением pH среды в люмене от 7,0–7,5 до pH \approx 5,7 [Kramer et al., 1999; Cruz et al., 2001; Takizawa et al., 2007]. Принимая во внимание эти результаты, мы исследовали фотоингибирование ФС2 и действие разобщителей NH₄Cl и нигерицина [Sen et al., 2014], которые устраняют протонный градиент, на этот процесс. Фотоинактивация отслеживалась посредством измерения скорости выделения кислорода с использованием акцептора электронов 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (0,2 мМ). Тилакоидные мембраны суспендировали в трициновом буфере с pH 7,6 (20 мкг Хл/мл), освещали (1300 мк $\Im \cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$) при 25 °C и измеряли скорость выделения кислорода. Результаты приведены в таблице 3. Согласно полученным данным скорость фотоинактивации тилакоидных мембран несколько меньше скорости фотоинактивации препаратов ФС2 (рис. 2 и таблица 3). Однако разобщители значительно ускоряют этот процесс (таблица 3).

Таблица 3. Влияние разобщителей на фотоинактивацию функции выделения кислорода тилакоидными мембранами

Тидакондина мамбранц	Скорость выделения O_2 , мкмоль O_2 мг $Xл^{-1} \cdot y^{-1}$		
тилакоидные мемораны	инкубация в темноте	через 40 мин освещения	
без разобщителей	$184 \pm 5 (100\% \pm 2,7\%)$	$114 \pm 9 (62,0 \% \pm 4,9 \%)$	
+ 2 мМ NH ₄ Cl	$270 \pm 15 \ (100 \ \% \pm 5,6 \ \%)$	67 ± 5 (24,8 % ± 1,9 %)	
+ 6 мкМ нигерицина	261 ± 14 (100 % ± 5,4 %)	55 ± 5 (21,1 % ± 2,3 %)	

Так как разобщители устраняют протонный градиент, увеличивая величину рН в люмене (место локализации КВК), этот результат может рассматриваться как дополнительное свидетельство того, что pH = 5,7 обеспечивает максимальную защиту Φ C2 от фотоингибирования. Однако необходимо отметить, что взаимосвязь между ΔpH и фотоингибированием существует и в ряде других механизмов фотопротекции (см. обзор [Ruban et al., 2012]). Такая взаимосвязь имеет место в механизме нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла. Светозависимое закисление люмена также запускает другой механизм фотопротекции — ксантофильный цикл [Demmig-Adams, Adams, 1996; Derks et аl., 2015]. Цикл инициируется формированием ΔpH и обеспечивает обратимую конверсию виолоксантина и зеаксантина. Синтез зеаксантина стимулирует рассеивание энергии в антенных комплексах.

Совпадение величины pH = 5,7, при которой увеличивается защищенность ФС2 от фотоингибирования, с величиной pH люмена при условиях генерации оптимального трансмембранного pH-градиента означает, что pH-зависимый структурный переход в области pH 5,7 может играть роль нового (неизвестного

ранее) pH-зависимого механизма самозащиты фотосинтетического аппарата от фотоинактивации. Схема подобного механизма представлена на рис. 4 и заключается в следующем: в тилакоидных мембранах в темноте КВК, локализованный в люмене, находится в среде с pH \approx 7,0–7,5 [Kramer et al., 1999]. Освещение сопровождается генерацией Δ pH на тилакоидной мембране и уменьшением pH в люмене до величины \approx 5,7, т. е. до pH максимальной защиты от фотоингибирования. Таким образом, обнаруженный нами эффект обеспечивает дополнительный механизм защиты Φ C2 от фотоингибирования в условиях освещения.



Рис. 4. Схема pH-зависимого механизма защиты фотосинтетического аппарата от фотоинактивации

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Литература

- Allakhverdiev S. I., Yruela I., Picorel R., Klimov V. Bicarbonate is an essential constituent of the water-oxidizing complex of photosystem II // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 5050–5054. — DOI: 10.1073/pnas.94.10.5050.
- Bernát G., Morvaridi F., Feyziyev Y., Styring S. pH dependence of the four individual transitions in the catalytic S-cycle during photosynthetic oxygen evolution // Biochemistry. — 2002. — Vol. 41. — P. 5830–5843. — DOI: 10.1021/bi011691u.
- Chernev P., Fischer S., Hoffmann J., Oliver N., Assunção R., Yu. B., Burnap R. L., Zaharieva I., Nürnberg D. J., Haumann M., Dau H. Light-driven formation of manganese oxide by today's photosystem II supports evolutionarily ancient manganese-oxidizing photosynthesis // Nat. Commun. — 2020. — Vol. 11, Art. ID 6110.

- Cruz J. A., Sacksteder C. A., Kanazawa A., Kramer D. M. Contribution of electric field $(\Delta \psi)$ to steady-state transthylakoid proton motive force (PMF) in vitro and in vivo. Control of PMF parsing into $\Delta \psi$ and ΔpH by ionic strength // Biochemistry. 2001. Vol. 40. P. 1226–1237. DOI: 10.1021/bi0018741.
- Damoder R., Dismukes G. C. pH dependence of the multiline, manganese EPR signal for the (S_2) state in PS II particles. Absence of proton release during the $S_1 \rightarrow S_2$ electron transfer step of the oxygen evolving system // FEBS Lett. 1984. Vol. 174. P. 157–161. DOI: 10.1016/0014-5793(84)81096-0.
- Davletshina L. N., Semin B. K. pH dependence of photosystem II photoinhibition: relationship with structural transition of oxygen-evolving complex at the pH of thylakoid lumen // Photosynth. Res. 2020. Vol. 145. P. 135–143. DOI: 10.1007/s11120-020-00769-0.
- Demmig-Adams B., Adams W. W., III. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis // Trends Plant Sci. — 1996. — Vol. 1. — P. 21–26. —DOI: 10.1016/S1360-1385(96)80019-7.
- Derks A., Schaven K., Bruce D. Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change // Biochim. Biophys. Acta. — 2015. — Vol. 1847. — P. 468–485. —DOI: 10.1016/j.bbabio.2015.02.008.
- Ghanotakis D. F., Topper J. N., Yocum C. F. Exogenous reductants reduce and destroy the Mn-complex in photosystem II membranes depleted of the 17 and 23 kDa polypeptides // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 767. P. 524–531. —DOI: 10.1016/0005-2728(84)90051-3.
- Ghirardi M. L., Lutton T. W., Seibert M. Interactions between diphenylcarbazide, zinc, cobalt, and manganese on the oxidizing side of photosystem II // Biochemistry. 1996. Vol. 35. P. 1820–1828. DOI: 10.1021/bi951657d.
- Ghosh I., Khan S., Banerjee G., Dziarski A., Vinyard D. J., Debus R. J., Brudvig G. W. Insights into Proton-Transfer Pathways during Water Oxidation in Photosystem II // J. Phys. Chem. B. 2019. Vol. 123. P. 8195–8202.
- Haddy A., Hatchell J. A., Kimel R. A., Thomas R. Azide as a competitor of chloride in oxygen evolution by photosystem II // Biochemistry. — 1999. — Vol. 38. — P. 6104– 6110. — DOI: 10.1021/bi983075c.
- Hakala M., Tuominen I., Keränen M., Tyystjärvi T., Tyystjärvi E. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — Vol. 1706. — P. 68–80. — DOI: 10.1016/ j.bbabio.2004.09.001.
- Johnson J. E., Webb S. M., Thomas K., Ono S., Kirschvink J. L., Fischer W. W. Manganeseoxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2013. — Vol. 110, No. 28. — P. 11238–11243.
- Kim C. J., Debus R. J. Evidence from FTIR difference spectroscopy that a substrate H_2O molecule for O_2 formation in photosystem II is provided by the Ca ion of the catalytic Mn_4CaO_5 cluster // Biochemistry. 2017. Vol. 56. P. 2558–2570. —DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01278.

- Klimov V. V., Allakhverdiev S. I., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A. Effect of extraction and re-addition of manganese on light reactions of photosystem-II preparations // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 148. — P. 307–312. — DOI: 10.1016/0014-5793(82)80830-2.
- Klimov V. V., Shafiev M. A., Allakhverdiev S. I. Photoinactivation of the reactivatipon capacity of photosystem II in pea subchloroplast particles after a complete removal of manganese // Photosynth. Res. — 1990. — Vol. 23. — P. 59–65. —DOI: 10.1007/BF00030063.
- Kramer D. M., Sacksteder C. A., Cruz J. A. How acidic is the lumen? // Photosynth. Res. 1999. Vol. 60. P. 151–163. DOI: 10.1023/A:1006212014787.
- Kuntzleman T., McCarrick R., Penner-Hahn J., Yocum C. Probing reactive sites within the photosystem II manganese cluster: evidence for separate populations of manganese that differ in redox potential // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2004. — Vol. 6. — P. 4897– 4904. — DOI: 10.1039/B406601D.
- Lovyagina E. R., Davletshina L. N., Kultysheva M. Y., Timofeev K. N., Ivanov I. I., Semin B. K. Characteristic features of the interaction between Fe (II) cations and the donor side of the manganese-depleted photosystem II // Russian Journal of Plant Physiology. — 2005. — Vol. 52 (1). — P. 7–14.
- Lovyagina E. R., Semin B. K. Competitive interaction of Mn(II) and Fe(II) cations with the high-affinity Mn-binding site of the photosystem II: evolutionary aspect // Orig. Life Evol. Biosph. 2022. DOI: 10.1007/s11084-022-09625-8.
- Nagata T., Zharmukhamedov S. K., Khorobrykh A. A., Klimov V. V., Allakhverdiev S. I. Reconstitution of the water-oxidizing complex in manganese-depleted photosystem II preparations using synthetic Mn complexes: A fluorine-19 NMR study of the reconstitution process // Photosynth. Res. — 2008. — Vol. 98. — P. 277–284. — DOI: 10.1007/s11120-008-9319-9.
- Ono T., Inoue Y. Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment // FEBS Lett. 1988. Vol. 227. P. 147–152. DOI: 10.1016/0014-5793(88)80886-X.
- Ono T., Inoue Y. Abnormal redox reactions in photosynthetic O₂-evolving centers in NaCl/EDTA-washed PS II. A dark-stable EPR multiline signal and an unknown positive charge accumulator // Biochim. Biophys. Acta. — 1990. — Vol. 1020. — P. 269– 277. — DOI: 10.1016/0005-2728(90)90157-Y.
- Ono T.-A., Mino H. Unique binding site for Mn^{2+} ion responsible for reducing an oxidized Y_Z tyrosine in manganese-depleted photosystem II membranes // Biochemistry. 1999. Vol. 38. P. 8778–8785.
- Pospišil P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. — 2012. — Vol. 1817. — P. 218–231. — DOI: 10.1016/j.bbabio.2011.05.017.
- Ruban A. V., Johnson M. P., Duffy C. D. P. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1817. P. 167–181. DOI: 10.1016/j.bbabio.2011.04.007.
- Saito K., Shen J. R., Ishida T., Ishikita H. Short hydrogen bond between redox-active tyrosine Y_Z and D1-His190 in the photosystem II crystal structure // Biochemistry. — 2011. — Vol. 50 (45). — P. 9836–9844.

- Schiller H., Dau H. Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S₂-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy // J. Photochem. Photobiol. B. 2000. Vol. 55. P. 138–144. DOI: 10.1016/S1011-1344(00)00036-1.
- Schlodder E., Meyer B. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll a_{II} (P-680) in Photosystem II particles from Synechococcus sp. // Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol. 890. — P. 23–31. — DOI: 10.1016/0005-2728(87)90064-8.
- Semin B. K., Ivanov I. I., Rubin A. B., Parak F. High-specific binding of Fe(II) at the Mnbinding site in Mn-depleted PSII membranes from spinach // FEBS Lett. — 1995. — Vol. 375. — P. 223–226. — DOI: 10.1016/0014-5793(95)01215-Z.
- Semin B. K., Parak F. Coordination sphere and structure of the Mn cluster of the oxygenevolving complex in photosynthetic organisms // FEBS letters. — 1997. — Vol. 400 (3). — P. 259–262.
- Semin B. K., Ghirardi M. L., Seibert M. Blocking of electron donation by Mn(II) to Y_Z[•] following incubation of Mn-depleted photosystem II membranes with Fe(II) in the light // Biochemistry. — 2002. — Vol. 41. — P. 5854–5864. — DOI: 10.1021/bi0200054.
- Semin B. K., Davletschina L. N., Aleksandrov A. Yu., Lanchinskaya V. Yu., Novakova A. A., Ivanov I. I. pH dependence of iron binding to the donor side of photosystem II // Biochem. Mosc. — 2004. — Vol. 69. — P. 410–419. — DOI: 10.1023/B:BIRY.0000022066.38297.8a.
- Semin B. K., Seibert M. Iron Bound to the High-Affinity Mn-Binding Site of the Oxygen-Evolving Complex Shifts the pK of a Component Controlling Electron Transport via Y_Z // Biochemistry. — 2004. — Vol. 43. — P. 6772–6782.
- Semin B. K., Lovyagina E. R., Timofeev K. N., Ivanov I. I., Rubin A. B., Seibert M. Iron-Blocking the High-Affinity Mn-Binding Site in Photosystem II Facilitates Identification of the Type of Hydrogen Bond Participating in Proton-Coupled Electron Transport via Y_Z⁻// Biochemistry. — 2005. — Vol. 44 (28). — P. 9746–9757.
- Semin B. K., Seibert M. A carboxylic residue at the high-affinity, Mn-binding site participates in the binding of iron cations that block the site // Biochim. Biophys. Acta. — 2006a. — Vol. 1757 (3). — P. 189–197. — DOI: 10.1016/j.bbabio.2006.02.001.
- Semin B. K., Seibert M. Flash-Induced Blocking of the High-Affinity Manganese-Binding Site in Photosystem II by Iron Cations: Dependence on the Dark Interval between Flashes and Binary Oscillations of Fluorescence Yield // J. Phys. Chem. B. — 2006b. — Vol. 110. — P. 25532–25542.
- Semin B. K., Davletshina L. N., Timofeev K. N., Ivanov I. I., Rubin A. B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca²⁺-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // Photosynth. Res. — 2013. — Vol. 117 (1). — P. 385–399.
- Semin B. K., Davletshina L. N., Rubin A. B. Correlation between pH dependence of O₂ evolution and sensitivity of Mn cations in the oxygen-evolving complex to exogenous reductants // Photosynth. Res. 2015. Vol. 125. P. 95–103. DOI: 10.1007/s11120-015-0155-4.

- Semin B. K., Seibert M. Substituting Fe for two of the four Mn ions in photosystem II effects on water-oxidation // J. Bioenerg. Biomembr. 2016. Vol. 48. P. 227-240. DOI: 10.1007/s10863-016-9651-2.
- Semin B. K., Davletshina L. N., Seibert M., Rubin A. B. Creation of a 3Mn/1Fe cluster in the oxygen-evolving complex of photosystem II and investigation of its functional activity // J. Photochem. Photobiol. B. 2018. Vol. 178. P. 192–200. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.016.
- Semin B. K., Davletshina L. N., Goryachev S. N., Seibert M. Ca²⁺ effects on Fe(II) interactions with Mn-binding sites in Mn-depleted oxygen-evolving complexes of photosystem II and on Fe replacement of Mn in Mn-containing, Ca-depleted complexes // Photosynth. Res. — 2021. — Vol. 147 (2). — P. 229–237. — DOI: 10.1007/s11120-020-00813-z.
- Shen J.-R., Inoue Y. Low pH-induced dissociation of three extrinsic proteins from O₂evolving photosystem II // Plant Cell Physiol. — 1991. — Vol. 32 (3). — P. 453–457. — DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078101.
- Shen J.-R. The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. — 2015. — Vol. 66. — P. 23–48. — DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120129.
- Sen K., Ghosh A., Chakraborty M., Maity S., Ghosh S., DasGupta M. Trans-thylakoid ΔpH dependent oscillation of FPSI/FPSII under continuous irradiance in isolated thylakoids // J. Bioenerg. Biomembr. 2014. Vol. 46. P. 71–82. DOI: 10.1007/s1086 3-013-9533-9.
- Suga M., Akita F., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Nakajima Y., Shimizu T., Yamashita K., Yamamoto M., Ago H., Shen J.-R. Native structure of photosystem II at 1,95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses // Nature. — 2015. — Vol. 517. — P. 99– 103. — DOI: 10.1038/nature13991.
- Suzuki H., Sugiura M., Noguchi T. pH dependence of the flash-Induced S-state transitions in the oxygen-evolving center of photosystem II from Thermosynechoccoccus elongatus as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy // Biochemistry. — 2005. — Vol. 44. — P. 1708–1718. — DOI: 10.1021/bi0483312.
- Takizawa K., Cruz J. A., Kanazawa A., Kramer D. M. The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced PMF // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — Vol. 1767. — P. 1233– 1244. — DOI: 10.1016/j.bbabio.2007.07.006.
- Tyystjärvi E. Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster // Coord. Chem. Rev. 2008. Vol. 252. P. 361–376. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.08.021.
- Tsui E. Y., Agapie T. Reduction potentials of heterometallic manganese–oxido cubane complexes modulated by redox-inactive metals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2013. — Vol. 110. — P. 10084–10088. — DOI: 10.1073/pnas.1302677110.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1,9 Å // Nature. — 2011. — Vol. 473. — P. 55–60. —DOI: 10.1038/nature09913.

- Vass I., Styring S. pH-Dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials // Biochemistry. — 1991. — Vol. 30. — P. 830–839. — DOI: 10.1021/bi00217a037.
- Virgin I., Styring S., Andersson B. Photosystem II disorganization and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 233. — P. 408–412. — DOI: 10.1016/0014-5793(88)80472-1.
- Zavafer A., Cheah M. H., Hillier W., Chow W. S., Takahashi S. Photodamage to the oxygen evolving complex of photosystem II by visible light // Sci. Rep. — 2015. — Vol. 5. — P. 16363. — DOI: 10.1038/srep16363.

Highly efficient binding of iron cations and their substitution of manganese cations in the catalytic center of the oxygen-evolving complex of photosystem II

L. N. Davletshina, A. V. Loktyushkin, E. R. Lovyagina, B. K. Semin

Department of Biophysics, Faculty of Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia E-mail: seminbk@mail.ru

Photosystem II (PSII) in the oxygenic photosynthetic organisms contains a catalytic center carrying out one of the most important bioenergetic reactions — light-dependent oxidation of water to molecular oxygen. The catalytic center consists of 4 manganese cations and 1 calcium cation interconnected by oxygen bridges - Mn₄CaO₅. Authors of the article during the study of the interaction of Fe(II) cations with the donor side of PSII membrane preparations without oxygen-evolving complex (OEC) found highly effective and specific binding of them to Mn-binding sites, which is a unique phenomenon. The presented work provides a brief overview of author's studies the possibility of manganese cations substitution with iron cations in the OEC of native PSII preparations and the effects observed in this process. In particular, the binding parameters of Fe(II) cations with Mn-binding sites in the Mn-depleted PSII and substitution of Mn cations with iron cations in the native PSII are characterized. The resistance of manganese cations in the Ca-depleted PSII membranes to the action of reductants, including Fe(II) cations, at different pH is considered. Separately, a structural transition in the manganese cluster at pH = 5.7 accompanied by a change in the redox potential of the manganese cation (s) and an increase in the resistance of the Mn cluster to the action of reductants is discussed. It is assumed that the structural transition in the Mn cluster at pH = 5.7 is involved in the mechanism for protecting the PSII from photoinhibition. A special section is devoted to the formation of a unique cluster of 3Mn1Fe in the OEC of Ca-depleted PSII at pH = 5,7. PSII membrane preparations with such a chimeric cluster are able to release oxygen in the presence of exogenous calcium cations under illumination (about 25 % of the rate in the native PSII). The competitive interaction of Mn(II) and Fe(II) cations with the Mn-binding sites in Mn-depleted PSII membranes mimicking the protophotosystem is discussed in an evolutionary aspect.

Keywords: photosystem II, oxygen-evolving complex, iron, manganese, calcium, high-affinity Mn-binding site, photoinhibition.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

В. И. Лобышев¹

Рассмотрена проблема слабых воздействий на биологические и модельные системы, проявляющихся в немонотонном характере отклика на монотонно уменьшающиеся концентрации биологически активных веществ — проблема, которая долго неоднозначно принимается научным сообществом и в решение которой внесли значительный вклад отечественные исследователи. Основное внимание уделено свойствам воды и разбавленных водных растворов, а также процессов, происходящих в воде при интенсивном перемешивании. Показано, что вода является сложной гетерогенной системой, практически всегда неравновесна, содержит значительное количество примесей в виде растворенных газов и материалов стенок сосуда в микромолярном и наномолярном диапазонах концентраций. В воде под действием механических сил и низкоинтенсивных излучений образуются активные формы кислорода и азота, приводящие к появлению длительных сопряженных цепных электрон-радикальных реакций, в том числе циклического характера. Неклассическое поведение разбавленных водных растворов связано с образованием мезочастиц размером порядка сотни нанометров, а их появление коррелирует с повышением биологической активности. Многие результаты не укладываются в рамки традиционных физико-химических представлений. Перечислены вопросы, требующие экспериментального подтверждения и теоретического обоснования.

Ключевые слова: вода, самоорганизация, активная среда, механохимия, активные формы кислорода, азота, разбавленные растворы, микрогетерогенность.

Рассматриваемая проблема возникает при попытках объяснения эффектов воздействия малых концентраций и физических факторов малой интенсивности на биологические и модельные объекты. В рамках общепринятой парадигмы, свойства раствора и его биологическая активность монотонно изменяются линейно или нелинейно с ростом концентрации растворяемого вещества. Вместе с тем, очень давно было обнаружен немонотонный характер отклика живых организмов на монотонно изменяющееся в широких пределах интенсивности внешнее воздействие. При этом может даже изменяться знак эффекта. Первые эксперименты, показывающие в малых дозах стимулирующее влияние различных химических соединений на функционирование живых организмов, были

¹ Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова.

E-mail: lobyshev@yandex.ru

опубликованы еще в конце XIX века. Этот феномен был объяснен стимулирующим действием вызывающих стресс веществ, но еще недостаточных для проявления вредных последствий, и назван гормезисом [Southam, Ehrlich, 1943]. Позднее стимулирующее воздействие аналогичного характера было обнаружено и для ионизирующего излучения и, по аналогии, было названо радиационным гормезисом [Кузин, 1977; Эйдус, 2001]. При исследовании действия слабых неионизирующих электромагнитных полей также были обнаружены немонотонные эффекты, зависящие от интенсивности и частоты электромагнитных полей естественного происхождения [Чижевский, 1976; Темурьянц и др., 1992; Бинги, 2011]. Со второй половины 1970-х годов появляется нарастающий поток работ, в которых исследуется широкий диапазон концентраций действующих биологически активных веществ на различные функции более простых модельных систем [Перчихин и др., 1977; Ямскова и др., 1977а, б; Шангин-Березовский и др., 1980, 1982; Бурлакова и др., 1986, 1999; Молочкина и др., 1999], где представление о гормезисе теряют смысл.

Характерным примером могут служить представленные на рис. 1 результаты эксперимента с двухоптимумным ответом степени ингибирования протеинкиназы C на концентрацию антиоксиданта α -токоферола [Пальмина и др., 1999]. Необычность этой зависимости состоит в наличии максимума при малых (их называют также сверхмалыми) концентрациях действующего вещества в области 10⁻¹⁴ М и «мертвой зоны», лежащей обычно в области 10⁻⁷-10⁻¹¹ М. При повышении концентрации до 10⁻⁴ М появляется обычно наблюдаемый максимум активности. Еще одна возможная особенность высокоразбавленных растворов состоит в том, что их значительное действие может проявляться на фоне большей эндогенной концентрации того же вещества в изучаемой модели. Например, опиоиды модулируют иммунную активность различных клеток в концентрациях 10⁻¹⁸-10⁻¹⁴ М, хотя те же опиоидные пептиды присутствуют в клетках в значительно большей естественной концентрации $10^{-10} - 10^{-12}$ M [Brown, Van Epps, 1985; Zaitsev et al., 1991]. Аналогичные эффекты были также обнаружены при сочетанном действии фармакологических средств и гомеопатических препаратов в высоком разбавлении [Эпштейн, 2008, 2013]. Однотипность ответа разнообразных модельных систем в виде немонотонной полимодальной зависимости измеряемых параметров от концентрации действующего реагента в области малых и сверхмалых концентраций заставляет задуматься об общей причине возникновения этих эффектов. Общим компонентом всех этих экспериментов является вода. Предположение об определяющей роли воды подкрепляется также результатами экспериментов по действию электромагнитных полей низкой интенсивности, где предварительно экспонированная в поле вода проявляет физико-химические отличия от исходной воды и вызывает биологические эффекты [Lobyshev, 2005].



Рис. 1. Зависимость степени ингибирования протеинкиназы С от концентрации α-токоферола [Пальмина и др., 1999]

Технически удобнее получать растворы малых концентраций биологически активных веществ разбавлением более концентрированного раствора. Во многих случаях малые концентрации достигаются путем однотипного последовательного разбавления (в 10 или 100 раз, или в иной пропорции) с активным механическим встряхиванием после каждого разбавления, приводящим к быстрому турбулентному перемешиванию раствора. Такой метод приготовления образцов соответствует принятой в гомеопатии технологии приготовления препаратов. В этом случае так называемые потенцированные образцы со сверхвысокой степенью «разбавления», когда понятие концентрации теряет смысл и уместно говорить только о количестве повторов указанных операций, удивительным образом могут проявлять биологическую активность, также зависящую немонотонно от количества «разбавлений», а саму зависимость от количества итераций корректнее называть паттерном. В качестве примера можно привести собственные результаты экспериментов по проращиванию семян амаранта. Проращивание наблюдали в растворе сахарозы, рассматривая ее как стрессовый фактор. В пластиковых чашках Петри помещали по 50 семян и добавляли по 2 мл раствора из заранее подготовленной серии десятичных разбавлений, сопровождающихся потенцированием. При исходной весовой концентрации сахарозы равной 10 % прорастание семян не наблюдается, но 1 % сахарозы уже не мешает прорастанию. Полученные сложные немонотонные зависимости эффективности прорастания от числа итераций разбавления-потенцирования приведены на рис. 2. Статистическая значимость полученного результата подкрепляется повторным экспериментом, проведенным с недельным интервалом, результаты которого также представлены на рис. 2. Коэффициент линейной корреляции между этими двумя паттернами составляет 0,82, что говорит о наличии сильной корреляции. Дополнительно были проведены контрольные эксперименты в 10 чашках Петри, которые показали величину среднеквадратичного отклонения между чашками равной 6,6 %. Обращает на себя внимание резкое уменьшение прорастания в области N = 7-9, где N = 8 соответствует концентрации сахарозы $3 \cdot 10^{-9}$ М. Область N = 25-27, где наблюдается минимум прорастания, принадлежит мнимым концентрациям, хотя этот результат также не вызывает сомнения.



Рис. 2. Процент прорастания семян амаранта в водном растворе сахарозы при последовательном разбавлении с потенцированием с количеством итераций N в двух независимых экспериментах. Нижняя кривая — прорастание через 36 ч, верхняя — через 48 ч

Эти экспериментальные факты не укладываются в рамки традиционных представлений. Не рассматривая сейчас разнообразные предлагаемые механизмы наблюдаемых эффектов, отметим, что во всех случаях мы работаем с водными растворами и возникает вопрос, как ведут себя физико-химические характеристики разбавленных растворов и применимо ли к ним понятие бесконечно разбавленных растворов, под которыми в классической физической химии понимаются растворы с концентрацией менее 10⁻³–10⁻⁵ М. Часто утверждают, что наблюдаемые сложные эффекты связаны со структурой воды, не приводя при этом достаточных аргументов.

Вода, столь привычная в нашей жизни и принципиально необходимая для живых организмов, по крайней мере в известных для нас формах, оказывается непонятной во многих своих свойствах. Кажущаяся простота молекулы воды — это самая маленькая трехатомная молекула, предопределяет ее электронную структуру и резко выделяет ее от ближайших изоэлектронных аналогов. Атом кислорода в молекуле воды имеет две неподеленные пары электронов, что определяет тетраэдрическую конфигурацию электронных оболочек кислорода и уникальную возможность образовать четыре водородных связи с соседними молекулами воды. Будучи дважды донором и дважды акцептором протона в водородных связях, молекулы воды способны к образованию развитой пространственной сети водородных связей. К интерпретации понятия структуры жидкой воды вернемся позже, а сначала рассмотрим, что такое реальная вода, поскольку это не только ансамбль молекул H₂O.

Вода содержит:

- ионы H⁺ и OH⁻ в концентрации 10⁻⁷ М вследствие диссоциации;
- кроме молекул $H_2^{16}O$ другие основные стабильные изотопные формы, $H_2^{17}O$, $H_2^{18}O$ и DH¹⁶O в количестве ¹⁸O 0,20 % (~ 0,1 M), ¹⁷O 0,04 % (~ 0,02 M), D = ²H 0,015 % (~ 15 MM);
- орто ↑НОН↑ и пара ↑НОН↓ молекулы (естественное статистическое распределение форм 3:1);
- растворенные газы окружающего воздуха, нанопузырьки;
- растворенные органические и неорганические примеси из воздуха и материала сосуда;
- активные формы кислорода и азота и, как следствие, вариабельный окислительно-восстановительный потенциал.

Рассмотрим перечисленные пункты более подробно. Диссоциация нейтральной молекулы воды на ионы H^+ и OH^- — процесс динамический, равновесная константа диссоциации воды без примесей мала и составляет $1,82 \cdot 10^{-16}$ моль/л, а константы скоростей диссоциации и рекомбинации равны $2,5 \cdot 10^{-5}$ с⁻¹ и $1,4 (\pm 0,2) \cdot 10^{11}$ л/(моль·с) соответственно. Энтальпия гидратации протона составляет ~ 276 ккал/моль и превышает более, чем на 100 ккал/моль, энтальпию гидратации любого другого одновалентного иона. Это свидетельствует о том, что протоны сильно взаимодействуют с молекулами воды и образуют ионы гидроксония H_3O^+ или более сложные комплексы. Среднее время ассоциации протона с данной молекулой воды оценено М. Эйгеном в 10^{-12} с, а средний интервал между ассоциациями данной молекулы воды с протоном — $5 \cdot 10^{-4}$ с [Эйзенберг, Кауцман, 1975].

В состав молекул природной воды входят два стабильных изотопа водорода 1 H, 2 H = D и три изотопа кислорода. Они могут образовать 9 изотопных разновидностей молекул воды.

Пять из неуказанных выше форм имеют концентрацию менее 6 10⁻⁵ %. Хотя основная часть воды представлена молекулами H₂¹⁶O, количество основных изотопных форм молекул воды, выраженное в молях, как указано выше, характеризуется достаточно большими величинами, сравнимыми с количеством основных ионов Na, K, Ca, Mg в живой клетке [Лобышев, Калиниченко, 1978]. Наряду с понятными изотопными эффектами обогащенной тяжелой воды, наблюдаются неожиданно большие эффекты при небольшой вариации изотопного состава относительно его природного состава, не нашедшие до сих пор адекватного объяснения [Лобышев и др., 1978а; Лобышев, 1983, 2018; Basov et al., 2019]. Кроме указанных стабильных изотопов существуют радиоактивные изотопы кислорода ¹⁴O, ¹⁵O, ¹⁹O, но их время жизни менее двух минут, а также изотоп водорода — тритий ³H = T, у которого период полураспада составляет 12,32 года. Тритий образуется в атмосфере в результате взаимодействия вторичных ядерных частиц космического излучения, в основном нейтронов и протонов, с ядрами азота и кислорода. Вскоре после образования тритий окисляется и образует молекулы воды в форме НТО. Равновесное количество трития, генерируемого космическими лучами, составляет 3-10 кг, содержится в основном в воде и лишь 7 % в атмосфере. Ввиду малости концентраций трития в природной воде его принято выражать в «тритиевых единицах» — ТЕ. Такая единица соответствует содержанию одного атома трития на 10¹⁸ атомов протия и эквивалентна 7,2 распада в минуту на 1 кг воды или 0,12 Бк/кг. Тритий является мягким *β*-излучателем с максимальной энергией электронов 18,6 кэВ и средним значением 5,7 кэВ, а конечным продуктом распада трития является стабильный изотоп гелия ³Не. Концентрация трития значительно выросла вследствие испытаний ядерного оружия и достигала десятков тысяч ТЕ в 1974 г. Содержание трития снижается во времени, сильно варьирует от местности и наличия техногенных источников трития. До проведения ядерных испытаний количество трития в пресноводных источниках не превышало 1 Бк/л. Сейчас среднее количество трития в пресных водах европейской части РФ составляет около 4 Бк/л [Ферронский, Поляков, 2009].

Впервые спиновые модификации молекулы водорода орто- H_2 со спином J = 1 и пара- H_2 со спином J = 0 были независимо предсказаны В. Гейзенбергом и Ф. Хундом в 1927 г., и в этом же году эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение. Водород при низкой температуре удалось фракционировать, поскольку орто- и пара-молекулы водорода обладают большим различием во вращательных уровнях энергии. Оно составляет 170,6 К, что значительно больше, чем температура кипения жидкого водорода (20,4 К).

Метод разделения спиновых изомеров состоял в охлаждении газа до 20,4 К в присутствии катализатора, ускоряющего спиновую конверсию (например, Fe(OH)₃). После достижения равновесия практически все молекулы переходили на нижний вращательный уровень J = 0, т. е. переходят в пара-изомеры. После нагревания газа получали газ в пара-состоянии, сохраняющийся из-за очень медленной конверсии. Для чистого водорода характерное время составляет 1 год при комнатной температуре и нормальном давлении. Подробнее об этом можно прочитать в книге [Фаркас, 1935]. Значительно позднее с использованием новых современных технологий были фракционированы спиновые изомеры других многоатомных молекул, таких как CH₂O, CH₃F и др., обладающих значительно меньшим различием в энергиях вращательных степеней свободы и более высокой температурой кипения [Chapovsky, Hermans, 1999]. Уже не приходится удивляться тому, что молекулы с идентичными ядрами в симметричных молекулах, таких как NH₃, CH₄, N₂ и др., существуют в природе в форме спиновых изомеров, для которых правила отбора предписывают определенные вращательные квантовые числа для разных спиновых изомеров. Создана база данных HITRAN, содержащая разнообразные спектроскопические характеристики высокого разрешения паров воды, ее изотопологов и около 300 молекул газов и дополнительных молекул, встречающихся в атмосфере [Gordon, 2017].

Как и молекула водорода, молекула воды может быть в двух спин-изомерных формах — орто-изомера, в котором ядерные спины протонов параллельны J = 1, и пара-изомера, в котором спины антипараллельны J = 0. При нормальной температуре орто-изомерам соответствуют три проекции спина 1, 0, -1, а пара-изомерам — только одна со спином 0. Поэтому в условиях термодинамического равновесия соотношение орто:пара должно быть равным 3:1 и только при низких температурах (ниже 50 К) оно стремится к нулю при $T \to 0$ К. Разделение спин-изомеров воды впервые удалось реализовать в процессе конденсации паров воды на углекислом газе [Конюхов и др., 1986]. Позднее разделение спин-изомеров воды было достигнуто методом хроматографии при медленной прокачке смеси водяного пара с азотом в качестве газа-носителя сквозь адсорбционную колонку, заполненную пористым углем. Выходящий из колонки газ направлялся в кювету, сопряженную с субмиллиметровым ЛОВ-спектрометром. В кювете рабочую смесь зондировали на частотах 30-40 см⁻¹ пучком перестраиваемого по частоте монохроматического излучения [Вигасин и др., 2002; Tikhonov, Volkov, 2002]. Разделение спиновых модификаций воды было получено также при использовании перестраиваемых лазерных диодов [Степанов и др., 2005]. В перечисленных работах измерения проводили в газовой фазе при пониженном давлении паров около 3 Торр. В работе других авторов разделения спиновых изомеров достигнуть не удалось, но в этой работе давление паров воды было на два порядка больше [Вебер и др., 2006]. На рис. 3
представлена схема нижних вращательных уровней энергии, где стрелками обозначены регистрируемые переходы и, соответствующие им, узкие линии поглощения паров воды, прошедших через адсорбент.



Рис. 3. (а) Схема нижних вращательных уровней энергии орто- и пара-изомеров воды, (б) спектры пропускания паров воды [Вигасин и др., 2002; Tikhonov, Volkov, 2002]

Результатом этих работ стало заключение о том, что константы связывания спиновых изомеров с адсорбентом различаются, орто-изомеры слабее связываются, чем пара-изомеры, и первой волной выходят из хроматографической колонки. Таким образом, статистическое соотношение изомеров 3:1 нарушается и, в данном эксперименте, увеличивается до 11:1.

Обогащенные порции водяного пара вымораживались с помощью азотной ловушки и хранили в холодильнике в замороженном состоянии. Через некоторое время образцы размораживали и вновь подвергали спектральному анализу. В результате время жизни спиновых изомеров было оценено в десятки минут для жидкой воды и месяцы для льда. Поскольку переходы между орто- и пара-изомерами молекулы запрещены, водяной пар является смесью независимых долгоживущих орто- и пара-фракций. Возможность наблюдения запрещенных колебательно-вращательных переходов между орто- и пара-изомерами воды

была детально теоретически исследована [Miani, Tennyson, 2004]. Вместе с тем механизм спиновой конверсии остается не ясен. Было обнаружено также, что помимо угля в качестве спин-модификаторов воды могут выступать многие другие вещества с развитой поверхностью типа цеолитов и силикагеля. Это дает основание предположить наличие возможных нарушений соотношения орто:пара в других естественных процессах [Вигасин и др., 2002]. Высказанное предположение было подтверждено предпочтительной адсорбцией пара-изомеров воды лиофилизованными препаратами ДНК, лизоцима, коллагена, а также цеолитом и солями CaO и CuSO₄. Оказалось, что разница в скоростях связывания спин-изомеров воды слабо зависит от свойств сорбента при их принципиальном различии в механизмах связывания с водой [Potekhin, Khusainova, 2005]. Кроме того, было обнаружено, что селективность связывания орто- и пара-воды уменьшается с увеличением влажности сорбента.

Приведенные результаты получены в парах воды при низком давлении, когда молекулы можно считать свободными. В жидкости из-за уширения полос очень слабой интенсивности не удается различить спиновые модификации стандартными спектроскопическими методами, однако сомневаться в наличии ортои пара-состояний воды также не приходится. Различить орто- и пара-состояния молекул воды в жидком состоянии удалось с использованием метода нелинейной когерентной лазерной спектроскопии четырехфотонного рассеяния [Бункин и др., 2006]. В этом методе используются встречные пучки лазерного излучения с частотами ω_1 и ω_2 , лежащими в области видимого света, а разность этих излучений перестройкой ω_2 сканируется в микроволновом диапазоне. Источником излучения ω_1 является лазер с плотностью мощности около 60 MBT см⁻² с круговой поляризацией, вторым источником — лазер с перестраиваемой частотой с плотностью мощности около 10 MBT · см⁻² и линейно поляризованным излучением. Измеряемым параметром служит состояние поляризации излучения на частоте смешения $\omega = \omega_1 - (\omega_1 - \omega_2)$. Эта методика позволила изучить диапазон от 1 до 100 см⁻¹. Не вдаваясь в подробное описание этого сложного нелинейного метода, отметим, что полученные спектры являются результатом усреднения после 10-30 вспышек лазерного излучения при частоте повторения импульсов генерации лазеров 1 Гц и длительности импульсов около 10 пс. В жидкой воде были зарегистрированы спектры либраций молекул, совпадающие по частоте с вращательным спектром H₂O в газовой фазе. Наиболее интенсивными оказались линии 79,8 см⁻¹ для пара-изомера и 88,1 см⁻¹ для орто-изомера. Эксперименты, проведенные в растворах биополимеров (ДНК, α-химотрипсин), показали, что в присутствии биополимеров существенно возрастает резонансный вклад вращательного спектра воды [Бункин и др., 2006, 2007]. Авторы констатируют, что механизм этого явления не ясен и предполагают, что биополимеры нарушают сетку водородных связей в воде так, что увеличивается количество свободных молекул. Этот вывод, однако, противоречит всем известным экспериментальным и теоретическим результатам. Учитывая высокую интенсивность лазерного излучения, гетерогенность образцов и быстрое время перестройки электронной структуры H_2O , меньшее, чем время зондирующего импульса (10 пс), трудно сказать, какую систему мы реально изучаем. На этот вопрос еще следует получить обоснованный ответ. Вместе с тем учет наличия орто- и парасостояний протона в симметричных молекулах заслуживает внимания, и эта тема продолжает развиваться [Pershin, 2009; Bunkin, Pershin, 2010].

В воде, находящейся в равновесии с окружающим воздухом, всегда находятся растворенные газы, среди которых доминируют азот, кислород, углекислый газ. Коэффициенты растворимости азота, кислорода и углекислого газа известны и составляют при нормальных условиях 0,016; 0,032 и 0,879 л газа/л воды соответственно. Средняя относительная концентрация этих газов в воздухе равна 0,781; 0,209 и 0,0004. При этом их содержание в воде составит 0,589 мМ; 0,289 мМ и 1,57 $\cdot 10^{-5}$ М. Взаимодействие углекислого газа с водой приводит к появлению угольной кислоты, которая, в свою очередь, диссоциирует. Таким образом в воде появляются анионы HCO_3^- в концентрации более 10^{-5} М, что в области нейтральных значений рН подтверждается экспериментально с высокой точностью, а полная картина содержания карбонатов в воде в широком диапазоне pH, варьируемой с помощью добавок HCl и NaOH, представлена на рис. 4 [Xibo et al., 2018].



Рис. 4. Равновесные концентрации карбонатов в воде (М) при стандартных условиях

По этой причине дистиллированная вода в открытом сосуде без дополнительных примесей имеет значение pH 5,5 меньшее, чем ожидаемое значение рН 7. Наличие растворенных газов влечет за собой образование стабильных газовых пузырьков, размер которых увеличивается от 9,6 до 57,8 нм при увеличении концентрации NaCl в растворе от 10^{-6} до 10^{-2} М. При этом могут образовываться бабстонные кластеры микронных размеров [Бункин и др., 2009; Бункин, Бункин, 2016].

Вода активно растворяет все примеси неорганического и органического происхождения, находящиеся в воздухе и материале сосуда, в котором находится вода. Уместно напомнить также, что в воздухе для больничных палат нормируемое (ГОСТ 2007 — идентичен международному стандарту ISO) количество только лишь колониеобразующих частиц составляет 500 шт/м³, максимальное число «пылевых» частиц размером, равным и более 0,5 мкм, в операционных помещениях не должно превышать 3 520 000 штук в м³, а их количество в палатах даже не нормируется. Показательным примером могут служить результаты исследования «аномальной» сверхплотной конденсированной воды в кварцевых капиллярах, полученной впервые Н. Н. Федякиным и активно исследуемой в то время Б. В. Дерягиным, в нескольких сотнях экспериментов, выполненных за два года в разных частях земного шара после публикации Липпинкотта о том, что эта вода возможно является полимерной структурой [Lippincott et al., 1969]. Оказалось, что кроме растворенного кремния в конденсированной внутри кварцевых капилляров воде обнаруживаются и другие вещества, но только имеющиеся в лаборатории. Наш давний опыт показал, что в стеклянном бидистилляторе электропроводность бидистиллята оказывается выше, чем в дистилляте за счет растворения ионов Na из стекла, что было установлено спектральным анализом. При этом содержание Ca и Mg в бидистилляте действительно уменьшалось. Хочется напомнить также, что такое вещество как AgCl, считающееся нерастворимым, дает насыщенный водный раствор с концентрацией 1,34 · 10⁻⁵ М.

В настоящее время в основной массе работ можно увидеть фразу: «использовалась вода класса 1 с удельным сопротивлением 18,2 МОм см». На рисунке 5 представлены результаты измерения электропроводности такой воды во времени при ее нахождении в стеклянном цилиндрическом сосуде диаметром 2,5 см, высотой 11 см. Измерения проводили на кондуктометре CDM 2e, Radiometer (Копенгаген) с калиброванной ячейкой CDC 104, имеющей три кольцевых электрода на внутренней поверхности стеклянной трубки диаметром 1,5 см, высотой 10 см, помещенной в стеклянный цилиндр с исследуемой водой. Погрешность измерений составляла не более 5 %. Как видно из приведенных данных, электропроводность даже в начальной точке значительно выше ожидаемой (из-за переливаний, промывки электрода и т. д.) и быстро возрастает. Медленное увеличение электропроводности долго не прекращается и через неделю достигает 5,1 мкС см⁻¹.



Рис. 5. Зависимость удельной электропроводности воды MQ от времени

Все приведенные выше факты убедительно свидетельствуют о том, что реальная вода гетерогенна по своему составу. Концентрации всех вышеперечисленных компонент зависят от множества внешних условий, включающих предысторию воды, температуру и давление. Самая чистая коммерческая вода для хроматографии «Fisher Scientific» гарантирует отсутствие лишь избранных ионов Al, Cd, Cr, Cu, K на уровне 10 ppb, т. е. на уровне 10^{-8} . Таким образом, условно чистая вода, даже в лабораторных условиях, является многокомпонентным раствором, практически всегда неравновесна и нарушает многие устойчивые представления об идеальной жидкости и растворе. Чистую воду, состоящую только из молекул H₂O, можно наблюдать лишь на листе бумаги или на экране монитора компьютера.

Вода весьма чувствительна к внешним физическим воздействиям. Уже более 50 лет известно, что ультразвуковая кавитация в воде приводит к появлению гидроксил-радикала OH', нитрит NO₂ и, в меньшей степени, нитрат NO₃ ионов. С разработкой технологии одиночного пульсирующего пузырька удалось на один цикл схлопывания пузырька количественно измерить выход OH, NO_x, а также фотонов, чей спектр не был характеристичен и простирался от 800 до 200 нм с увеличением интенсивности в коротковолновой части спектра [Didenko, 2002]. Спектр такого вида в рамках модели черного тела говорит о температуре внутри пузырька, достигающей 20 000 К, что, в свою очередь, говорит о возможности ионизации внутреннего содержимого пузырька и последующих ион-электронных рекомбинационных процессах. Появление активных форм кислорода и азота в нано- и микромолярных концентрациях неизбежно влечет за собой каскад сопряженных цепных электрон-радикальных реакций и изменений окислительно-восстановительного потенциала среды весьма важного для функционирования живых систем. К появлению активных форм кислорода в воде приводят также такие низкоинтенсивные механические воз-

действия, как ультразвук докавитационной интенсивности, продавливание воды через капилляры и мембраны [Веселов, 1991; Домрачев и др., 1993, 1995]. Очень интересен результат, полученный при вибрации сосуда с водой. Такая процедура приводит к появлению не только активных форм кислорода, но и регистрируемого объема выделяющихся газов кислорода и водорода, причем частоты вибраций около 1 Гц оказываются наиболее эффективными [Styrkas, Nikishina, 2009; Styrkas, 2011]. Не так давно вышла статья, повторяющая появление перекиси водорода при выдавливании микрокапель воды из капилляра [Lee et al., 2019]. Авторы этой работы не цитируют отечественных авторов и отмечают, что, хотя вода и является привычной жидкостью, она обладает многими непонятными свойствами. Адекватного понимания механизмов образования активных форм кислорода и, тем более азота, в воде на сегодняшний день не существует. Наиболее вероятным в качестве инициаторов активных форм кислорода, по аналогии с кавитацией, можно рассматривать спонтанно образующиеся нанопузырьки, названные бабстонами [Бункин, Бункин, 2016]. Недавно выполненная работа подтверждает это предположение [Gudkov et al., 2020]. В ней показано, что в сосудах с водой, подвергавшихся колебаниям амплитудой в 5 мм и частотой 30 Гц, появляются стабильные пузырьки со средним размером 600 нм. При этом наблюдается «синяя» люминесценция, характерная для сонолюминесценции. Количество перекиси водорода и гидроксил радикала растет со временем механического воздействия и с ростом частоты колебаний от 30 до 60 Гц, напротив количество растворенного кислорода уменьшается со временем механической обработки.

Наряду с этим было обнаружено, что даже при выдерживании воды при температуре 40 °C в течение часа в ней появляются активные формы кислорода и молекулы перекиси водорода H₂O₂ [Chernikov, Bruskov, 2002], а при выдерживании при температуре 70 °С даже окислы азота [Chernikov, Bruskov, 2005]. Аналогичные удивительные эффекты наблюдаются и при освещении воды видимым светом, а также квазимонохроматическим светом небольшой интенсивности в полосах поглощения молекулярного кислорода в видимом и ИК-диапазоне спектра [Gudkov et al., 2011]. Образование активных форм кислорода под влиянием внешних слабых воздействий приводит к появлению длительных химических преобразований, в том числе циклического характера [Gudkov et al., 2012]. Полной ясности в механизмах описанных наблюдений нет. Известно около 40 реакций, в которых участвуют реагенты и продукты кислородно-водородных молекул [Ignatiev et al., 2008]. Среди них есть как очень быстрые, так и очень медленные реакции, что приводит к длительной эволюции системы [Binhi, Sarimov, 2014; Belovolova et al., 2014]. В воде, насыщенной атмосферным углекислым газом, донорами электронов могут выступить анионы гидрокарбонатов и воздействовать на протекание сопряженных цепных электрон-радикаль-

ных реакций [Воейков и др., 2012]. Инициатором этих процессов могут служить также природные источники ионизирующего излучения, среди которых следует назвать тритий и радиоактивный изотоп калия ⁴⁰К, распад которых сопровождается бета-излучением, приводящим к появлению гидратированных электронов. Так, в морской воде было зарегистрировано 80 мкМ гидратированных электронов за счет бета-излучения [Swallow, 1969]. Сходство процессов радиолиза, фотолиза и термолиза удивительно, поскольку энергии квантов в процессе термолиза и фотолиза видимым излучением воды недостаточно для разрыва ковалентной связи в молекуле воды и образования радикалов Н• и ОН•. Для объяснения этих фактов была предложена концепция воды как открытой неравновесной активной среды, которая накапливает энергию под воздействием теплового электромагнитного излучения и может освобождаться в результате слабых резонансных воздействий в областях поглощения кислородом квантов света с переходом О2 в синглетное состояние. Последующий коллапс нанопузырьков (бабстонов) в результате происходящего в них локального электромагнитного возбуждения и образование различных продуктов в ходе сопряженных цепных электрон-радикальных реакций приводит к разрыву химических связей в молекулах воды. При этом образующиеся продукты аналогичные тем, которые возникают при воздействии ионизирующих излучений с энергиями, значительно превышающими энергию химической связи в молекуле воды [Bruskov et al., 2020; Брусков, 2021]. Эта гипотеза уникальна, иллюстрируется рис. 6 и ожидает более детального экспериментального подтверждения и теоретического обоснования.



Рис. 6. Схема образования гидратированных электронов и синглетного кислорода в воде под действием ионизирующего и теплового излучения с энергией: $hv_1 = 5,17$ эВ, $hv_2 = 0,98$ эВ [Bruskov et al., 2021]

Очень часто при анализе сложных эффектов говорят об изменении структуры воды. Это, в принципе, неправильное высказывание. По определению, структура есть совокупность устойчивых связей объекта. Поэтому жидкая вода, обладающая трансляционной подвижностью, структуры не имеет. Можно говорить лишь о ближнем порядке. Тем не менее, это словосочетание стало устойчивым, а количество библиографических ссылок в интернете (Google) о «структуре воды» значительно превышает таковое о структуре ДНК или белка. Как уже говорилось выше, вода — единственная из своих гомологов обладает возможностью образования четырех водородных связей в тетраэдрической конфигурации, что предопределяет полиморфизм возможных структур. Вода в твердом состоянии обладает уникальным количеством полиморфных кристаллических структур, так совсем недавно была установлена новая структура льда XVIII [Millot et al., 2019]. Построение некристаллографических, параметрических структур, связанных, в частности, с биополимерами воды, значительно расширяет эти возможности [Бульенков, 1988, 1991]. Молекулярный дизайн параметрических структур из тетраэдрических элементов дает возможность построения практически неограниченного множества структурных элементов из молекул воды, включая хиральные, фрактальные и запрещенные в кристаллографии, но распространенные в биологическом мире [Лобышев и др., 2003].

Для описания состояния жидкой воды используют модели двух типов двух состояний, впервые четко сформулированную В. Рентгеном в 1891 г. и модель непрерывной сетки водородных связей, предложенную Дж. Берналом и Р. Фаулером в 1933 г., каждая из которых обрела множество модификаций. В качестве современного примера можно привести эволюцию взглядов одной научной группы, проводившей исследования жидкой воды с использованием синхротронного источника излучения. На начальной стадии исследований говорилось, как и в классической модели двух состояний, о наличии льдообразной и свободной воды, о кольцеобразных и линейных связанных структурах. В последнем самообзоре эти авторы пришли к тому, что жидкая вода является локально неоднородной жидкостью [Nilsson, Petterson, 2015]. В ней сосуществуют области тетраэдрически упорядоченной воды низкой плотности (LDL) и менее упорядоченной воды высокой плотности (HDL) без ясных фазовых границ, между которыми существуют флуктуационные переходы. Авторы обзора отмечают, что ближайшей задачей является определение степени неоднородности в воде и резкости границ раздела между флуктуирующими областями («a burning question is to determine the degree of heterogeneity in water and the sharpness of the boundaries between fluctuating regions»). При этом авторы перестали пользоваться понятиями льдообразных кластеров, употреблявшихся ими в более ранних работах. Точка зрения о динамическом локально неоднородном состоянии воды поддерживается также компьютерными расчетами [Маленков, 2020]. В этой работе обнаружено, что в жидкой воде имеются области пространства, в которых молекулы в среднем перемещаются в одном направлении. Эти области имеют размер более десяти нанометров и хорошо проявляются, если за системой наблюдать в течение времени порядка 100 пс, что можно рассматривать как своеобразную наноразмерную динамическую неоднородность жидкостей. Дальнейшее развитие эксперимента пошло по пути исследования переохлажденной воды с целью обнаружения предполагаемого фазового разделения двух состояний воды высокой и низкой плотности [Gallo et al., 2016].

Как уже говорилось ранее, проблема малых концентраций берет начало из биологических исследований, где был зарегистрирован в модельных системах немонотонный ответ на последовательно уменьшающиеся концентрации добавляемых биологически активных препаратов. Но что же происходит с физическими характеристиками воды при разбавлении? Структурные неоднородности в бинарных системах, в том числе вода, спирты или другие неэлектролиты, известны давно [Вукс, 1977]. Было установлено наличие двух максимумов интенсивности рассеянного света, характеризующего появление неоднородностей в растворе (рис. 7). Основной — широкий по концентрации добавленного компонента при мольной доле спирта X = 0,2-0,5 и другой, более узкий, при X = 0,01-0,05. Основной максимум обусловлен флуктуациями концентрации, а природа максимума при меньшей концентрации окончательно до сих пор не ясна.



Рис. 7. Зависимость интенсивности рассеянного света в системе трет-бутанол – вода от мольной доли спирта

Установлено, что равновесие в этих растворах устанавливается в течение длительного времени, вплоть до нескольких дней после смешивания жидкостей [Bulavin et al., 2016]. Длительность эволюции этих систем очень похожа на полученные нами в экспериментах с другими водными растворами при значительно меньшей концентрации примесей в воде. Наши исследования флюоресценции воды и разбавленных растворов пептидов показали наличие флюоресценции у дистиллированной воды, не связанное с возможным наличием примесей гуминовых кислот, резкое возгорание интенсивности люминесценции при уменьшении концентрации люминофора глицилтриптофана до 10⁻⁷ М и появление пика люминесценции у нелюминесцирующего дипептида — глициласпарагина в этом же диапазоне концентраций, а также длительное время эволюции спектров излучения [Lobyshev et al., 1994, 1999; Лобышев и др., 1999]. Спектры возбуждения и соответствующие спектры излучения изученных растворов различны, что характерно для кристаллофосфоров. В рамках этого представления область возбуждения была оценена в 100 нм. Нами были также выполнены эксперименты по изучению флюоресценции широкого ряда последовательно разбавленных растворов NaCl, которые подвергались интенсивному механическому воздействию (потенцированию) после каждого десятикратного разбавления [Lobyshev, Tomkevitch, 2001]. Результаты представлены на рисунке 8.



Рис. 8. Зависимость интенсивности флюоресценции от числа десятичных разбавлений раствора хлористого натрия. Образец 13-го десятичного разбавления соответствует концентрации соли $2 \cdot 10^{-12}$ М. Длина волны возбуждения 300 нм, излучения — 385 нм. Среднеквадратичная погрешность измерения соответствует размеру точки

Таблица 1. Корреляция между спонтанной подвижностью одноклеточных *Spirostoma ambiguum* (усл. ед.) в потенцированных растворах хлористого натрия и интенсивностью флюоресценции (усл. ед.) этих растворов

Разбавление	2	9	11	12	13	14	15	16	17
Подвижность	$0,0 \pm$	7,7±	$11,8 \pm$	$11,7 \pm$	$0,0 \pm$	$0,0 \pm$	9,1 ±	6,7 ±	8,7 ±
инфузорий	$\pm 0,0$	± 2,6	± 1,4	$\pm 0,6$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 1,8$	± 2,6	$\pm 1,8$
Интенсивность	56	17	15	13	56	41	18	16	17
флюоресценции									

Было установлено наличие резкого увеличения интенсивности флюоресценции в области 10^{-13} – 10^{-14} М, сохранявшегося в течение длительного времени. Аналогичный паттерн был получен нами позднее в другой лаборатории. Впервые нами также была установлена высокая отрицательная корреляция (коэффициент линейной корреляции $\rho = -0,93$) между интенсивностью флюоресценции раствора хлористого натрия и спонтанной активностью пресноводных одноклеточных организмов, т. е. между физическими характеристиками и биологической активностью растворов [Лобышев и др., 2005]. Позднее методом NTA (nanoparticle tracking analysis) мы обнаружили в этой области концентраций наличие наночастиц размером 96–115 нм в количестве (3 ± 2)· 10^8 частиц/мл.

Аналогичный сложный немонотонный паттерн был получен при измерении высокочастотной электропроводности потенцированных растворов диклофенака (рис. 9). В этой работе использовали процедуру последовательных сотенных разбавлений с потенцированием, включая мнимые концентрации при N>11. Эволюцию получаемого паттерна наблюдали в течение двух недель после приготовления растворов [Lobyshev, 2019]. При точности измерений не хуже 0,5 % наблюдаются значительные вариации электропроводности от числа итераций разбавление-потенцирование. С увеличением времени хранения растворов электропроводность монотонно возрастает и растет контрастность паттерна, т. е. различие между минимальными и максимальными значениями. Парные коэффициенты корреляции между результатами этих экспериментов равны соответственно: 1:2 — 0,87, 1:3 — 0,65, 1:4 — 0,72, 2:3 — 0,70, 2:4 — 0,80, 3:4 — 0,87. Критическое значение коэффициента корреляции для 12 степеней свободы при 1%-ном уровне значимости R(0,01) = 0,66. Превышение этого критического значения означает достоверное сходство эволюционирующих паттернов. Такое сходство однозначно говорит о том, что причина немонотонного изменения электропроводности разбавленных растворов заключается в методе их приготовления.

Стоит также отметить, что диэлектрическая проницаемость с точностью 0,2 % на частотах 100 кГц – 3 МГц остается постоянной, что говорит об отсутствии появления в растворах частиц с большим дипольным моментом. Столь





Рис. 9. Эволюция паттернов сопротивления (кОм) для серии сотенных разбавлений с потенцированием раствора диклофенака. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: • — 1 день, ■ — 2 дня, • — 5 дней, ▲ — 14 дней

Представленные выше эксперименты ясно показывают, что процедура потенцирования изменяет коллективные свойства водного раствора, и эти свойства запоминаются системой в течение длительного времени, далекого от микроскопического масштаба времени молекулярных реорганизаций, обычно принимаемого в рассмотрение при обсуждении физических свойств жидкостей. Поэтому вопрос о памяти воды можно свести к определению памяти. Ясно только, что к структуре воды память не имеет никакого отношения. Немонотонное изменение различных физических характеристик и появление наночастиц обнаруживали разными методами в сильно разбавленных растворах, в том числе в потенцированных растворах, в которых расчетная концентрация меньше 10^{-20} M [Rey, 2003; Elia et al., 2004, 2014; Pershin et al., 2015, 2016].

Значительная роль в изучении физико-химических характеристик разбавленных растворов принадлежит группе А. И. Коновалова, которая исследовала более 60 химических веществ разными методами и установила, что подавляющее большинство из них образуют наночастицы при больших степенях разбавления, определяемых методом динамического светорассеяния. При этом установлено, что для их самоорганизации, как правило, необходимо наличие естественного электромагнитного фона. При выдерживании растворов в условиях гипомагнитного поля, создаваемого пермаллоевым экраном, наночастицы в регистрируемом количестве не образуются [Ryzhkina et al., 2009, 2015; Konovalov et al., 2014]. Этот вывод подтверждается экспериментом с получением наночастиц при выдерживании образцов в поле частотой 7,85 Гц, амплитудой 48 А/м, создаваемом в катушке соленоида, размещенного в пермаллоевом экране [Konovalov et al., 2015]. В работах этой группы на ряде микроорганизмов и действующих веществ подтверждается также корреляция между появлением наночастиц и возрастанием биологической активности в растворе. Повышенная биологическая активность фармакологических препаратов в коллоидной форме известна также из других работ. Так, например, было показано, что феназепам обладает фармакологической активностью в сверхмалых дозах только в дисперсном состоянии в виде наночастиц диаметром не более 100-300 нм, а образование наночастиц навязывается добавлением поверхностно-активных реагентов в процессе приготовления препарата [Стовбун, 2012]. Дополнительную информацию на тему изменения ферментативной активности в зависимости от формы препарата можно найти в [Wu et al., 2009]. Подробное обсуждение этого феномена выходит за рамки данной работы. Существование наночастиц в потенцированных водных растворах высокого разбавления подтверждено многими авторами и уже не вызывает сомнений, однако их строение и состав до сих пор неизвестны. В области высоких концентраций растворенных веществ эти процессы становятся незначимыми. Можно считать, что многократный процесс механического потенцирования с последующим разбавлением является не только, а при больших числах итерации и не столько, разбавлением, сколько механохимической модификацией веществ, содержащихся в растворе. Это косвенно подтверждается реализацией химических реакций в порошковых системах с механической обработкой, не идущих в обычных условиях, разложением воды на магнитной мешалке в присутствии некоторых солей [Ikeda et al., 1999], а также прямым наблюдением осадков в высушенных каплях более 200 фармпрепаратов в сверхмалых и мнимых концентрациях методами просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей туннельной микроскопии [Rajendran, 2015].

Выше были рассмотрены свойства последовательно разбавленных и потенцированных растворов различных веществ. Но, поскольку вода сама является сложным многокомпонентным раствором и чувствительна к внешним воздействиям, возникает вопрос, как будут меняться свойства условно чистой воды при аналогичной итерационной процедуре разбавления-потенцирования. На рис. 10 представлены результаты измерений интенсивности флюоресценции образцов потенцированной дистиллированной воды в последующем десятичном разбавлении исходной водой и повторением этой процедуры N раз [Lobyshev et al., 2005]. Как видно, уже первое потенцирование приводит к возрастанию интенсивности флюоресценции. Последующие итерации сопровождаются уменьшением интенсивности и ее резким спадом в области N = 12 до фоновых значений. Со временем хранения интенсивность в образцах N1–N11 заметно уменьшается, но все же сохраняется в течение 6 недель.



Рис. 10. Зависимость интенсивности флюоресценции от числа итераций N десятичных разбавлений дистиллированной воды с потенцированием. Длина волны возбуждения 300 нм, излучения — 385 нм

Аналогичный эксперимент был проведен с водой MQ 1-го класса с измерением электрических характеристик образцов [Lobyshev, 2021]. Результаты приведены на рис. 11. В данном случае после потенцирования образца выполняется сотенное разбавление исходной водой. Измерения проводили на частоте 100 кГц, погрешность измерений менее 0,5 %. Как и в случае разбавления диклофенака (рис. 9), наблюдается сложная немонотонная зависимость. В данном случае наблюдали эволюцию образцов в 20 итерациях, но аналогичные немонотонные зависимости получали и для 30 итераций, откуда можно сделать вывод, что их вообще может быть любое число. Как и в случае диклофенака, диэлектрическая проницаемость остается постоянной, что говорит об отсутствии структур с большим дипольным моментом. Паттерны серий образцов, приготовленных в разные дни, отличаются, но параллельно приготовленные две серии обладают одинаковыми паттернами с коэффициентом корреляции более 0,9. Такие результаты не вызывают удивления, если воду рассматривать как самоорганизующуюся активную среду, чувствительную к слабым возмущениям. В обоих случаях среднее значение электропроводности со временем увеличивается (сопротивление уменьшается), как и в случае с диклофенаком, но дисперсия результатов практически сохраняется и имеет тенденцию к уменьшению, а в растворах диклофенака на протяжении двух недель она возрастает со временем. Отсюда нетрудно заключить, что в растворах диклофенака происходят более сложные химические процессы.



Рис. 11. Эволюция паттернов сопротивления на частоте 100 кГц для серии сотенных разбавлений с потенцированием воды. Погрешность измерения не превышает размера точки. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: • — 1 день, ■ — 6 дней, ◆ — 8 дней, ▲ — 13 дней

Что же говорит теория о возможности образования мезоструктур нанометрового диапазона в жидкой воде? Существуют, основанные на представлениях квантовой электродинамики, теоретические предпосылки образования в растворах частиц, называемых когерентные домены, размер которых лежит в области сотни нанометров [Preparata, 1995; Arani et al., 1995; Del-Guidice et al., 2006; Vitiello, 2014]. По признанию Vitiello, эта теория имеет общий характер и не обладает предсказательной силой для конкретных случаев.

В качестве заключения следует отметить, что реальная вода даже в лабораторных условиях является сложным многокомпонентным раствором. Можно считать твердо установленным, что многократное последовательное разбавление растворов традиционным способом, или сопровождающееся интенсивным встряхиванием, приводит к самоорганизации в растворе, проявляющейся в появлении мезочастиц и немонотонном изменении физико-химических свойств разбавленных растворов. Неясен механизм этого феномена, молекулярный состав мезочастиц размером в сотни нанометров, возможная роль нанопузырьков в составе этих мезочастиц, а также роль слабых электромагнитных полей в их образовании. Решение этих фундаментальных физико-химических проблем будет способствовать решению общей проблемы биологической активности растворов малых и сверхмалых концентраций.

Литература

- Бинги В. Н. Принципы электромагнитной биофизики. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011. 592 с.
- Бульенков Н. А. Периодические диспирационно-модульные алмазоподобные структуры связанной «воды» возможные конструкции, определяющие конформацию биополимеров в структурах их гидратов // Кристаллография. — 1988. — Т. 33, № 2. — С. 424–444.
- Бульенков Н. А. О возможности роли гидратации как ведущего интеграционного фактора в организации биосистем на разных уровнях их иерархий // Биофизика. 1991. Т. 36, вып. 2. С. 181–243.
- Бункин А. Ф., Нурматов А. А., Першин С. М. Когерентная четырехфотонная спектроскопия низкочастотных либраций молекул в жидкости // УФН. — 2006. — Т. 176, № 5. — С. 883–889.
- Бункин А. Ф., Нурматов А. А., Першин С. М., Хусаинова Р. С., Потехин С. А. Четырехфотонная лазерная спектроскопия водных растворов в микроволновом диапазоне // Квант. электроника. — 2007. — Т. 37, № 10. — С. 941–945.
- Бункин Н. Ф., Бункин Ф. В. Бабстонные структуры воды и водных растворов электролитов // УФН. — 2016. — Т. 186, № 9. — С. 933–952.
- Бункин Н. Ф., Суязов Н. В., Шкиркин А. В., Игнатьев П. С., Индукаев К. В. Кластерная структура стабильных нанопузырей растворенного газа в глубоко очищенной воде // ЖЭТФ. — 2009. — Т. 135, № 5. — С. 917–937.
- Бурлакова Е. Б., Греченко Т. Н., Соколов Е. Н., Терехова С. Ф. Влияние ингибиторов радикальных реакций окисления липидов на электрическую активность изолированного нейрона виноградной улитки // Биофизика. — 1986. — Т. 31, № 5. — С. 921– 924.
- Бурлакова Е. Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Росс. хим. журн. 1999. Т. XLIII, № 5. С. 3–11.
- Вебер С. Л., Багрянская Е. Г., Чаповский П. Л. О возможности обогащения ядерных спиновых изомеров молекул H₂O при помощи адсорбции // ЖЭТФ. 2006. Т. 129, вып. 1. С. 80–95.
- Веселов Ю. С. Эффект накопления перекиси водорода при обратно-осмотическом опреснении морской воды // Химия и технология воды. — 1991. — Т. 13, № 8. — С. 741–745.
- Вигасин А. А., Волков А. А., Тихонов В. И., Щелушкин Р. В. Эффект спин-селективной адсорбции водяного пара // ДАН. 2002. Т. 387, № 5. С. 613–616.
- Воейков В. Л., Виленская Н. Д., Ха До Минь, Малышенко С. И., Буравлева Е. В., Яблонская О. И., Тимофеев К. Н. Устойчивое неравновесное состояние бикарбонатных водных систем // ЖФХ. 2012. Т. 86, № 9. С. 1518–1527.
- Вукс М. Ф. Рассеяние света в газах, жидкостях и растворах. Изд. ЛГУ, 1977. 320 с.
- Домрачев Г. А., Родыгин Ю. Л., Селивановский Д. А. Механохимически активированное разложение воды в жидкой фазе // ДАН. — 1993. — Т. 329, № 2. — С. 186–188.

- Домрачев Г. А., Родыгин Ю. Л., Селивановский Д. А., Стунжас П. А. Об одном из механизмов генерации пероксида водорода в океане // Химия морей и океанов. М.: Наука, 1995. С. 169–177.
- Конюхов В. К., Тихонов В. И., Тихонова Т. Л., Файзулаев В. Н. Разделение спинмодификаций молекул воды и тяжелой воды // Письма в ЖТФ. — 1986. — Т. 12, вып. 23.
- Кузин А. М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы. М.: Атомиздат, 1977. 133 с.
- Лобышев В. И., Калиниченко Л. П. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. — М.: Наука, 1978. — 215 с.
- Лобышев В. И., Твердислов В. А., Яковенко Л. В., Фогель Ю. Активирование Na, К-АТФазы малыми концентрациями D₂O, ингибирование — большими // Биофизика. — 1978. — Вып. 2. — С. 390–391.
- Лобышев В. И. Аномальное активирующее влияние тяжелой воды малой концентрации на регенерацию гидроидных полипов // Биофизика. 1983. № 4. С. 666–668.
- Лобышев В. И., Рыжиков Б. Д., Шихлинская Р. Э., Мазурова Т. Н. Собственная люминесценция воды и сильно разбавленных растворов дипептидов // Биофизика. — 1994. — Т. 39, вып. 4. — С. 565–570.
- Лобышев В. И., Соловей А. Б., Бульенков Н. А. Компьютерный модульный дизайн параметрических структур воды // Биофизика. 2003. Т. 48, вып. 6. С. 1011–1021.
- Лобышев В. И., Томкевич М. С., Петрушанко И. Ю. Экспериментальное исследование потенцированных водных растворов // Биофизика. 2005. Т. 50, вып. 3. С. 464–469.
- Лобышев В. И. О чем говорят изотопные эффекты тяжелой воды в биологических и модельных системах // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018. Т. 3, № 3. С. 511–519.
- Маленков А. Г. Структурная и динамическая неоднородность жидкостей // РЭНСИТ. 2020. Т. 12, № 1. С. 29–38.
- Молочкина Е. М., Озерова И. Б., Бурлакова Е. Б. Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной пероксидации в мембранах клеток головного мозга // Рос. хим. журн. — 1999. — Т. XLIII, № 5. — С. 63–71.
- Пальмина Н. П., Мальцева Е. Л., Пынзарь Е. И., Бурлакова Е. Б. Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеиназы С и ее эффекторов в процессе перекисного окисления // Росс. хим. журн. — 1999. — Т. XLIII, № 5. — С. 55–63.
- Перчихин Ю. А., Шангин-Березовский Г. Н., Раппопорт И. А. Изменение активности аминотрансфераз при воздействии N-нитрозо N-диэтилмочевиной на сыворотку крови. Химический мутагенез и создание сортов интенсивного типа. М.: Наука, 1977. С. 263.
- Степанов Е. В., Тихонов В. А., Миляев В. А. Диагностика молекул орто- и параводы с помощью перестраиваемых диодных лазеров // Квант. электроника. 2005. Т. 35, № 3. С. 205–206.

- Стовбун С. В., Киселев А. В., Занин А. М., Калинина Т. С., Воронина Т. А., Михайлов А. И., Берлин А. А. Влияние физико-химических форм феназепама и панавира на их действие в сверхмалых дозах // Бюл. эксп. биол. мед. — 2012. — Т. 153, № 4. — С. 441–444.
- Темурьянц Н. А., Владимирский Б. М., Тишкин О. Г. Сверхнизкочастотные электромагнитные сигналы в биологическом мире. — Киев: Наукова думка, 1992. — 188 с.
- Фаркас А. Ортоводород, пароводород и тяжелый водород. М.: ОНТИ, 1936.
- Ферронский В. И., Поляков В. А. Изотопия гидросферы земли. М.: Научный мир, 2009. 632 с.
- Чижевский А. Л. Земное эхо солнечных бурь. Изд. 2-е. М.: «Мысль», 1976. 367 с.
- Шангин-Березовский Г. Н., Перчихин Ю. А., Колбасин А. А. Влияние малых доз N-нитрозо N-диэтилмочевины на толерантность перепелов к токсичному действию некоторых мутагенов // Эффективность химических мутагенов в селекции. — Ин-т химфизики АН СССР, 1980.
- Шангин-Березовский Г. Н., Адамов В. Я., Рыхлецкая О. С., Молоскин С. А. Системный характер стимулирующего действия ультрамалых доз супермутагенов // Улучшение культурных растений и мутагенез. Ин-т химфизики АН СССР, 1982.
- Эйдус Л. Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз. М.: ИТЭФ РАН, 2001. 81 с.
- Эйзенберг Д., Кауцман В. Структура и свойства воды. Л.: Гидрометеоиздат, 1975. 280 с.
- Эпштейн О. И. Сверхмалые дозы (история одного исследования). М.: Изд. РАМН, 2008. 336 с.
- Эпштейн О. И. Феномен релиз-активности и гипотеза «пространственного» гомеостаза // Успехи физиологических наук. — 2013. — Т. 44, № 3. — С. 54–76.
- Ямскова В. П., Модянова Е. А., Резникова М. М., Маленков А. Г. Высокоактивные тканевоспецифические адгезивные факторы печени и легкого // Мол. биол. — 1977. — Т. 11, № 5.
- Ямскова В. П., Модянова Е. А., Левенталь В. И., Ланковская Т. П., Бочарова О. К., Маленков А. Г. Тканевоспецифические макромолекулярные факторы из печени и легкого: очистка и действие на механическую прочность ткани и клеток // Биофизика. 1977. Т. 22.
- Arani R., Bono I., Del-Guidice E., Preparata G. QED coherence and the thermodynamics of water // Int. J. Mod. Phys. B. — 1995. — Vol. 9. — P. 1813.
- Basov A., Fedulova L., Baryshev M., Dzhimak S. Deuterium-depleted water influence on the isotope 2H/1H regulation in body and individual adaptation // Nutrients. — 2019. — Vol. 11. — P. 1903–1922.
- Belovolova L. V., Glushkov M. V., Vinogradov E. A. Influence of dissolved gases on highly diluted aqueous media // Biophysics. 2014. Vol. 59, No. 4. P. 524–530.
- Bernal J. D., Fowler R. H. Theory of Water and Ionic Solution, with Particular Reference to Hydrogen and Hydroxyl Ions // J. Chem. Phys. 1933. Vol. 1. P. 515–548.

- Binhi V. N., Sarimov R. M. Relaxation of liquid water states with altered stoichiometry // Biophysics. — 2014. — Vol. 59, No. 4. — P. 515–519.
- Brown S. L., Van Epps D. E. Suppression of T lymphocyte chemotactic factor production by the opioid peptides beta-endorphin and met-enkephalin // J. Immunol. 1985. Vol. 134, No. 5. P. 3384–3390.
- Bruskov V. I., Chernikov A. V., Ivanov V. E., Karmanovaa E. E., Gudkov S. V. Formation of the Reactive Species of Oxygen, Nitrogen, and Carbon Dioxide in Aqueous Solutions under Physical Impacts // Physics of Wave Phenomena. — 2020. — Vol. 28, No. 2. — P. 103–106.
- Bruskov V. I., Karmanova E. E., Chernikov A. V., Usacheva A. V., Ivanov V. E., Emel'yanenko V. I. Formation of hydrated electrons in water under thermal electromagnetic exposure // Physics of Wave Phenomena. — 2021. — Vol. 29, No. 2. — P. 94–97.
- Bulavin L. A., Gotsul'skii V. Y., Malomuzh N. P., Chechko V. E. Relaxation and Equilibrium Properties of Dilute Aqueous Solutions of Alcohols // Russ. Chem. Bull. — 2016. — Vol. 65, No. 4. — P. 851–876.
- Bunkin A. F., Pershin S. M. Observation of Rotational Resonances of Ortho and Para Spin Isomers of the H₂O Molecule in Hexagonal Ice Using Four-Photon Laser Spectroscopy // Physics of Wave Phenomena. — 2010. — Vol. 18, No. 4. — P. 237–239.
- Chapovsky P. L., Hermans L. J. F. Nuclear spin conversion in polyatomic molecules // Annu. rev. phys. chem. 1999. Vol. 50. P. 315–345.
- Chernikov A. V., Bruskov V. I. Heat-induced generation of hydroxyl radicals and other redoxactive species in seawater // Biophysics. — 2002. — Vol. 47, No. 5. — P. 773–781.
- Chernikov A. V., Bruskov V. I. Fixation of atmospheric nitrogen in the water by heat or light with the formation of nitrogen oxides // Dokl. Biochem. and Biophys. 2005. Vol. 400, No. 1–6. P. 40–43.
- Del-Guidice E., Vitiello G. Role of the electromagnetic field in the formation of domains in the process of symmetry-braking phase transition // Phys. Rev. A. 2006. Vol. 74. P. 022105.
- Didenko Y. T., Suslick K. S. The energy efficiency of formation of photons, radicals and ions during single-bubble cavitation // Lett. to Nature. — 2002. — Vol. 418. — P. 394–397.
- Gallo P. et al. Water: A Tale of Two Liquids // Chem. Rev. 2016. Vol. 116. P. 7463-7500.
- Gordon I. E. The HITRAN 2016 molecular spectroscopic database // J. of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2017. Vol. 203. P. 3–69.
- Gudkov S. V., Bruskov V. I., Astashev M. E., Chernikov A. V., Yaguzhinsky L. S., Zakharov S. D. Oxygen-dependent Auto-oscillations of Water Luminescence Triggered by the 1264 nm Radiation // J. Phys. Chem. B. — 2011. — Vol. 115. — P. 7693–7698.
- Gudkov S. V., Karp O. E., Garmash S. A., Ivanov V. E., Chernikov A. V., Bruskov V. I., Monokhin A. A., Astashev M. E., Yaguzhinsky L. S. Generation of reactive oxygen species in water under exposure to visible or infrared irradiation at absorption bands of molecular oxygen // Biophysics. — 2012. — Vol. 57, No. 1. — P. 1–8.

- Gudkov S. V., Penkov N. V., Baimler I. V., Lyakhov G. A., Pustovoy V. I., Simakin A. V., Sarimov R. M., Scherbakov I. A. Effect of Mechanical Shaking on the Physicochemical Properties of Aqueous Solutions // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — Vol. 21. — P. 8033.
- Elia V., Niccoli M. New Physico-Chemical Properties of Extremely Diluted Aqueous Solutions // J. of Thermal Analysis and Calorimetry. 2004. Vol. 75. P. 815–836.
- Elia V., Ausanio G., Gentile F., Germano R., Napoli E., Niccoli M. Experimental Evidence of Stable water Nanostructures in Extremely Dilute Solutions at Standard Pressure and Temperature // Homeopathy. — 2014. — Vol. 103, No. 1. — P. 44–50.
- Ignatiev A. N., Pryakhin A. N., Lunin V. V. Numerical simulation of the kinetics of ozone decomposition in an aqueous solution // Rus. Chem. Bull. 2008. Vol. 57, No. 6. P. 1172–1178.
- Ikeda S., Takata T., Komoda M., Hara M., Kondo J. N., Domen K., Tanaka A., Hosono H., Kawazoe H. Mechano-catalysis a novel method for overall water splitting // Phys. Chem. Chem. Phys. 1999. Vol. 1. P. 4485–4491.
- Konovalov A. I., Ryzhkina I. S., Murtazina L. I., Kiseleva Y. V. Forming the Nanosized Molecular Assemblies (Nanoassociates) is a Key to Understand the Properties of Highly Diluted Aqueous Solutions // Biophysics. — 2014. — Vol. 59, No. 3. — P. 341–346.
- Konovalov A., Ryzhkina I., Maltzeva E., Murtazina L., Kiseleva Yu., Kasparov V., Palmina N. Nanoassociate formation in highly diluted water solutions of potassium phenosan with and without permaloy shielding // Electromagn. Biol. Med. — 2015. — Vol. 34, No. 2. — P. 141–146.
- Lee J. K., Walker K. L., Han H. S., Kang J., Prinz F. B., Waymouth R. M., Nam H. G., Zare R. N. Spontaneous generation of hydrogen peroxide from aqueous microdroplets // PNAS. — 2019. — Vol. 116, No. 39. — P. 19294–19298.
- Lippincott E. R. et al. Polywater // Science. 1969. Vol. 164. P. 1482-1487.
- Lobyshev V. I., Shikhlinskaya R. E., Ryzhikov B. D. Experimental evidence for intrinsic luminescence of water // J. Mol. Liquids. — 1999. — Vol. 82, No. 1–2. — P. 73–81.
- Lobyshev V. I. Long scale evolution of luminescent properties of water and glycyltryptophan solutions, influence of UV irradiation // Optical Diagnostics of Biological Fluids IV / ed.: A. V. Priezzev, T. Asakura. Proc. of SPIE, 1999. Vol. 3599. P. 52–57.
- Lobyshev V. I., Tomkevitch M. S. Luminescence Study of Homeopathic Remedies // Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring / A. V. Priezzhev, G. L. Cote (eds.). — Proc. of SPIE, 2001. — Vol. 4263. — P. 59–64.
- Lobyshev V. I., Solovey A. B., Bulienkov N. A. Computer construction of modular structures of water // J. Mol. Liquids. 2003. Vol. 106, No. 2–3. P. 277–297.
- Lobyshev V. I. Water is a sensor to weak forces including electromagnetic fields of low intensity // Electromagnetic Biol. and Med. — 2005. — Vol. 24, № 3. — P. 449–461.
- Lobyshev V. I. Dielectric Characteristics of Highly Diluted Aqueous Diclofenac Solutions in the Frequency Range of 20 Hz to 10 MHz // Physics of Wave Phenomena. 2019. Vol. 27, No. 2. P. 119–127.
- Lobyshev V. I. Evolution of High-Frequency Conductivity of Pure Water Samples Subjected to Mechanical Action: Effect of a Hypomagnetic Filed // Physics of Wave Phenomena. 2021. Vol. 29, No. 2. P. 98–101.

- Miani A., Tennyson J. Can ortho-para transitions for water be observed? // J. Chem. Phys. 2004. Vol. 120, No. 6. P. 2732–2739.
- Millot M. et al. Nanosecond X-ray diffraction of shock compressed superionic water ice // Nature. 2019. Vol. 569. P. 251–255.
- Nilsson A., Petterson L. G. M. The structural origin of anomalous properties of liquid water // Nature Communication. — 2015. — Vol. 6. — P. 8998.
- Pershin S. M., Ortho/Para H₂O Conversion in Water and a Jump in Fluidity of Erythrocytes through a Microcapillary at the Temperature $36,6 \pm 0,3$ C // Phys. of Wave Phenomena. 2009. Vol. 17, No. 4. P. 241–250.
- Pershin S. M., Bunkin A. F., Grishin M. Ya., Davydov M. A., Lednev V. N., Palmina N. P., Fedorov A. N. Correlation of Optical Activity and Light Scattering in Ultra-Low-Concentrated Phenosan-Potassium Aqueous Solutions // Dokl. Phys. — 2015. — Vol. 60. — P. 114–117.
- Pershin S. M., Bunkin A. F., Grishin M. Ya., Lednev V. N., Fedorov A. N., Palmina N. P. Bimodal dependence of light scattering. Fluctuations on the concentration of aqueous solutions // Phys. Wave Phenom. — 2016. — Vol. 24, No. 1. — P. 41–47.
- Potekhin S. A., Khusainova R. S. Spin-dependent absorption of water molecules // Biophysical Chemistry. — 2005. — Vol. 118. — P. 84–87.
- Preparata G. QED Coherence in Matter. Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific, 1995.
- Rajendran E. S. Nanodynamics. Kerala, India: Mohna Publ., 2015.
- Rey L. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride // Physica A. — 2003. — Vol. 323. — P. 67–74.
- Röntgen W. C. Uber die Constitution des flüssigen Wassers // Ann. d. Phys. u. Chem. N.F. 1891. – Vol. XLV. – P. 91–97.
- Ryzhkina I. S., Murtazina L. I., Kiseleva Y. V., Konovalov A. I. Properties of Supramolecular Nanoassociates Formed in Aqueous Solutions of Biologically Active Compounds in Low or Ultra-low Concentrations // Doklady Phys. Chem. — 2009. — Vol. 428, No. 2. — P. 196–200.
- Ryzhkina I. S., Murtazina L. I., Kiseleva Y. V., Konovalov A. I. Self-organization and Physicochemical Properties of Aqueous Solutions of the Antibodies to Interferon Gamma at Ultrahigh Dilution // Doklady Phys. Chem. — 2015. — Vol. 462, No. 1. — P. 110–114.
- Southam C. M., Ehrlich J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wooddecaying fungi in culture // Phytopathology. —1943. — Vol. 33. — P. 517–524.
- Styrkas A. D., Nikishina N. G. Chemical processes in moving water // Russian Journal of Inorg. Chem. — 2009. — Vol. 54, No. 6. — P. 961–968.
- Styrkas A. D. Composition of gaseous products produced upon oscillations of water // Russian Journal of Inorg. Chem. — 2011. — Vol. 56, No. 7. — P. 1029–1031.
- Swallow A. J. Hydrated electrons in seawater // Nature. 1969. Vol. 222 (5191). P. 369–340.
- Tikhonov V. I., Volkov A. A. Separation of water into its ortho and para isomers // Science. 2002. Vol. 296. P. 2363–2366.

- Vitiello G. On the isomorphism between dissipative systems, fractal self-similarity and electrodynamics. Toward an integrated vision of nature systems // Systems. 2014. Vol. 2. P. 203.
- Zaitsev S. V., Sazanov L. A., Koshkin A. A., Sud'ina G. F., Varfolomeev S. D. Respiratory birst inhibition in human neutrophils by ultra-low doses of [D-Ala²] methionine // FEBS Lett. 1991. Vol. 291. P. 84–86.
- Wu Z., Zhang B., Yan B. Regulation of Enzyme Activity through Interactions with Nanoparticles // Int. J. Mol. Sci. — 2009. — Vol. 10. — P. 4198–4209.
- Xibo Yan, Delgado M., Aubry J., Gribelin O., Stocco A., Da Cruz F. B., Bernard J., Ganachaud F. Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water Hydrophobic Interfaces // J. Phys. Chem. Lett. — 2018. — Vol. 9. — P. 96–103.

Physico-chemical peculiarities of dilute aqueous solutions and their biological activity

V. I. Lobyshev

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia E-mail: lobyshev@yandex.ru

The problem of weak impacts on biological and model systems, manifested in the non monotonous nature of the response to monotonically decreasing concentrations of biologically active substances, is considered — a problem that has long been ambiguously accepted by the scientific community and to the solution of which russian scientists have made a significant contribution. The main attention is paid to the properties of water and dilute aqueous solutions, as well as to the processes occurring in water during intensive mixing. It is shown that water is a complex heterogeneous system, usually nonequilibrium, and contains a significant amount of impurities in the form of dissolved gases and vessel wall materials in the micromolar and nanomolar concentration ranges. In water, under the influence of mechanical forces and low-intensity radiation, reactive forms of oxygen and nitrogen are formed, leading to the appearance of long-term conjugate chain electron-radical reactions, including cyclic ones. The non-classical behavior of dilute aqueous solutions is associated with the formation of mesoparticles of the order of hundreds of nanometers, and their appearance correlates with an increase in biological activity. Many of the results do not fit into the framework of traditional physico-chemical concepts. The questions that require experimental confirmation and theoretical justification are listed.

Keywords: water, self-organization, reactive medium, mechanochemistry, reactive oxygen and nitrogen species, dilute solutions, microheterogenicity.

МЕТОДЫ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В. А. Надточенко^{1, 2}, А. В. Айбуш¹

Развитие оптических технологий получения ультракоротких лазерных импульсов привело к появлению передовых подходов изучения фундаментальных свойств сложных по химическому составу объектов. Фемтосекундные лазерные импульсы в этом отношении предоставляют наиболее богатые возможности по созданию новых экспериментальных методик, которые используют амплитудные, временные и спектральные особенности лазерного излучения данного вида. Сверхкороткая длительность фемтосекундных импульсов позволяет изучать первичные время-разрешенные процессы в веществе вплоть до фемтосекундных и субпикосекундных масштабов времен. Малая энергия таких импульсов позволяет в значительной степени снизить разнообразные эффекты термического разогрева, а высокая пиковая интенсивность открывает возможности эффективного детектирования нелинейного отклика в веществе. Спектральная ширина фемтосекундных импульсов, которая может составлять тысячи обратных сантиметров, позволяет проводить широкополосное детектирование электронных и колебательных полос изучаемых систем. В частности, сфазированность спектральных компонент фемтосекундных импульсов, а также возможность создания импульсов с определенными фазовыми характеристиками позволяет изучать когерентные эффекты на ультракоротких временах, что дает новые знания об организации сложных молекулярных систем. Подходы, использующие несколько фемтосекундных импульсов с прецизионной временной задержкой вплоть до единиц аттосекунд, неколлинеарная конфигурация взаимодействия импульсов в веществе позволяет выделить изучаемый процесс по направлению, а также достигнуть одновременно высокого временного и спектрального разрешения, что открывает возможность изучения систем со сложными и перекрывающимися спектральными характеристиками. В данной работе приводится описание основных методов фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании биологических систем.

Ключевые слова: фемтосекундная лазерная спектроскопия, нелинейная оптика, возбуждение-зондирование, спектроскопия квантовых биений, квантовая когерентность, волновой пакет, фемтосекундная импульс-стимулированная спектроскопия комбинационного рассеяния, активирующий импульс, двухимпульсное фотонное эхо, двухмерная фемтосекундная спектроскопия.

В последние сорок лет значительный прогресс был достигнут в развитии методов лазерной спектроскопии и их применения в химии и биологии. Особое

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Косыгина 4.

² Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы.

место в этом направлении приобрели методы лазерной спектроскопии с использованием фемтосекундных лазеров. Методы фемтосекундной спектроскопии опираются на значительные достижения в развитии лазерной техники и технологиях получения сверхкоротких световых импульсов, а также достижения в развитии фундаментальных физических основ нелинейной оптики. Цель данной работы — дать для неспециалистов в области нелинейно оптики и физики лазеров описание методов фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании биологических систем.

Одним из очевидных преимуществ фемтосекундной лазерной спектроскопии является возможность исследовать быстропротекающие процессы. При этом, следует принять во внимание особенности фемтосекундного лазерного импульса и принципиальные отличия в технической реализации эксперимента сверхбыстрой лазерной спектроскопии по сравнению с методами кинетической спектроскопии с использованием лазеров наносекундного диапазона. При использовании наносекундного лазерного фотолиза можно и целесообразно использовать широкополосные осциллографы и фотодетекторы с быстрым временным разрешением. В фемтосекундной спектроскопии сверхвысокого разрешения измерение спектрального сигнала производится по принципу возбуждение-зондирование (pump-probe). Используются два или более импульсов — импульс(ы) накачки и пробный импульс(ы), между которыми устанавливается временная задержка t_d. Чтобы добиться временной синхронизации между импульсами возбуждения и зондирования, исходный фс-импульс генератора расщепляется либо на полупрозрачном зеркале, либо с использованием акустооптических модуляторов света, либо с использованием голографических делителей светового пучка или иным способом. Формируется два (или более) пучка — импульсов возбуждения и зондирования. Взаимодействие последовательности упорядоченных во времени этих импульсов в исследуемом объекте генерирует в соответствии с законами нелинейной оптики сигнал отклика системы, который регистрируется и из анализа которого можно делать определенные выводы о гамильтониане квантовой системы, о квантовых состояниях, о взаимодействии между компонентами системы и взаимодействии с окружающей средой.

В настоящее время существует ряд моделей нелинейной оптики, основанных на вполне интегрируемых уравнениях, которые используются для описания распространения ультракоротких и предельно коротких импульсов электромагнитного излучения. Для описания методов фемтосекундной спектроскопии, используемых в исследовании химических и биологических систем, используется полуклассическое описание взаимодействия молекулярной системы со светом [1–4]. Квантовая система описывается в терминах матрицы плотности ρ :

$$\rho = |\psi\rangle\langle\psi|,$$

$$|\psi\rangle = \sum_{n} c_{n} |n\rangle, \quad \langle\psi| = \sum_{n} c_{n}^{*} \langle n|, \quad \sum_{n,m} c_{n} c_{m}^{*} |n\rangle\langle m|,$$

где $|\psi\rangle$ — волновая функция; $|n\rangle$ — базис собственных состояний.

Матрица плотности *ρ* смешанного состояния для описания взаимодействия квантовой системы с окружающей средой (термодинамическим резервуаром) определяется как:

$$\begin{split} \rho &= \sum_{k} P_{k} \left| \psi_{k} \right\rangle \left\langle \psi_{k} \right|, \\ &\sum_{k} P_{k} = 1, \quad P_{k} \geq 0, \end{split}$$

где P_k — заселенность *k*-го состояния.

Квантовая система, не взаимодействующая со световым полем, описывается гамильтонианом H_0 . Взаимодействие со световым полем рассматривается в дипольном приближении как возмущение $H_{LM} = \boldsymbol{\mu} \cdot \boldsymbol{E}$, где оператор дипольного момента определяется как:

$$\boldsymbol{\mu} = \sum_{n,m} \boldsymbol{\mu}_{nm} |n\rangle \langle m|,$$
$$\boldsymbol{\mu}_{nm} = \langle n|\boldsymbol{e} \cdot \boldsymbol{r} |m\rangle.$$

Световое поле E(r, t) и поляризация среды P(r, t) рассматриваются классически в волновом приближении:

$$\nabla^2 \boldsymbol{E}(\boldsymbol{r},t) - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \boldsymbol{E}(\boldsymbol{r},t) = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \boldsymbol{P}(\boldsymbol{r},t).$$

Поляризация P(t) в точке *r* определяется через матрицу плотности и дипольный момент: $P(t) = \langle \mu \rangle = \text{Tr}[\mu \cdot \rho(t)].$

Поляризация **P**(t) представляется как сумма линейной и нелинейной составляющих:

$$\boldsymbol{P}(t) = \boldsymbol{\chi}^{(1)} \cdot \boldsymbol{E}(t) + \boldsymbol{\chi}^{(2)} \cdot \boldsymbol{E}(t) \cdot \boldsymbol{E}(t) + \boldsymbol{\chi}^{(3)} \cdot \boldsymbol{E}(t) \cdot \boldsymbol{E}(t) \cdot \boldsymbol{E}(t) + \cdots,$$
$$\boldsymbol{P}(t) = \sum_{i} \boldsymbol{P}^{(i)}.$$

Для оптической среды с инверсионной симметрией, в частности для изотропной среды, четные по полю восприимчивости $\chi^{(2i)}$, i = 1, 2, ..., равны нулю. Этот вывод следует из того, что при изменении направления поля *E* поляризация *P* должна менять знак на противоположный. Фазовый синхронизм. Произведение $E(t - t_3)E(t - t_3 - t_2)E(t - t_3 - t_2 - t_1)$ соответствует волновому вектору $k = \pm k_1 \pm k_2 \pm k_3$. Выбор определенного направления векторов k_i (с учетом знака) определит направление сигнального вектора k.

Эволюцию поляризации во времени можно представить как

$$\boldsymbol{P}(t) = \mathrm{Tr}[\boldsymbol{\mu}_{I}(t)\boldsymbol{\rho}_{I}(t)],$$

где

$$\mu_{I}(t) = e^{+\frac{i}{\hbar}H_{0}t}\mu e^{-\frac{i}{\hbar}H_{0}t},$$
$$H_{I}(t) = e^{+\frac{i}{\hbar}H_{0}t}H_{LM}e^{-\frac{i}{\hbar}H_{0}t} = \mu_{I}(t) \cdot E(t)$$

Оператор плотности $\rho(t)$ эволюционирует при гамильтониане $H_l(t)$:

$$\rho_{I}(t) = \Im e^{+\frac{i}{\hbar} \int_{t_{0}}^{t} H_{I}(t')dt'} \rho_{0} e^{-\frac{i}{\hbar} \int_{t_{0}}^{t} H_{I}(t')dt'},$$

где ρ_0 — оператор плотности в момент времени t_0 ; \Im — оператор временного упорядочения. В задачах с изотропной средой первым ненулевым членом в разложении по нелинейной поляризации является нелинейная поляризация третьего порядка $P^{(3)}$:

$$\rho_{I}^{(3)}(t) = \left(-\frac{i}{\hbar}\right)^{3} \int_{t_{0}}^{t_{1}'} dt_{3}' \int_{t_{0}}^{t_{3}'} dt_{2}' \int_{t_{0}}^{t_{3}'} dt_{1}' \left[H_{I}(t_{3}'), \left[H_{I}(t_{2}'), \left[H_{I}(t_{1}'), \rho_{0}\right]\right]\right]$$
$$P^{(3)}(t) = \left(-\frac{i}{\hbar}\right)^{3} \int_{t_{0}}^{t_{3}'} dt_{3}' \int_{t_{0}}^{t_{3}'} dt_{2}' \int_{t_{0}}^{t_{3}'} dt_{1}' E_{T}(t_{3}') E_{T}(t_{2}') E_{T}(t_{1}') \times$$
$$\times \mathrm{Tr}\left[\mu_{I}(t), \left[\mu_{I}(t_{3}'), \left[\mu_{I}(t_{2}'), \left[\mu_{I}(t_{1}'), \rho_{0}\right]\right]\right]\right].$$



Рис. 1. Импульсное приближение в случае трех импульсов. Импульсы не перекрываются во времени

Если световое поле рассматривается как последовательность трех импульсов

$$E(t) = E_1(t) \cdot \left(e^{+i\omega t} + e^{-i\omega t}\right) + E_2(t) \cdot \left(e^{+i\omega t} + e^{-i\omega t}\right) + E_3(t) \cdot \left(e^{+i\omega t} + e^{-i\omega t}\right),$$

то в выражении для $P^{(3)}$ находим $6 \times 6 \times 6 \times 4 = 864$ члена. Если последовательность во времени коротких импульсов упорядочена так, что задержка во времени между ними превышает их длительность (импульсное приближение), то число членов для $P^{(3)}$ понижается. Пусть импульсы не перекрываются во времени и первое взаимодействие $\mu(0)$ с импульсом $E(t_1)$, $\mu(t_1)$ с импульсом $E(t_2)$ и т. д. Число членов понижается с $6 \times 6 \times 6 \times 4$ до $2 \times 2 \times 2 \times 4 = 32$. Часто огибающую импульса аппроксимируют δ -функцией

$$\begin{split} \boldsymbol{E}_{1}(t) &= \boldsymbol{E}_{1}\delta(t)\Big(e^{-i\omega t+\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}}+e^{+i\omega t-\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}}\Big),\\ \boldsymbol{E}_{2}(t) &= \boldsymbol{E}_{2}\delta(t)\Big(e^{-i\omega t+\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}}+e^{+i\omega t-\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}}\Big),\\ \boldsymbol{E}_{3}(t) &= \boldsymbol{E}_{3}\delta(t)\Big(e^{-i\omega t+\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}}+e^{+i\omega t-\boldsymbol{k}\cdot\boldsymbol{r}}\Big). \end{split}$$

Если принимать во внимание в выражении для импульса либо $e^{-i\omega t}$ либо $e^{+i\omega t}$, но не оба члена, то число членов в выражении для $P^{(3)}$ понижается до $1 \times 1 \times 1 \times 4 = 4$.

Интерпретация данных нелинейной оптической спектроскопии с применением теории возмущений связана с анализом довольно громоздких выражений [3]. Особенно это важно для расчета нелинейной поляризации более высокого порядка, чем третий. Для систематизации анализа нелинейной поляризации, рассчитываемой по времезависимой теории возмущений, широко используются диаграммы Фейнмана, в которых удобно графически суммировать все члены рассчитанной нелинейной поляризации. Диаграммы Фейнмана дают визуальное представление о типах динамики возбужденного и основного состояния и/или когерентности, исследуются и могут быть легко преобразованы в расчеты вкладов в сигналы. Во многих случаях диаграммы упрощают расчеты и позволяют определить без сложного расчета нулевой вклад. Когда оптические импульсы строго упорядочены по времени-импульсное приближение, тогда лишь небольшое количество диаграмм вносят вклад в расчет нелинейной поляризации, но в ряде экспериментов анализ эффектов перекрытия импульсов важен для интерпретации результатов. При перекрывании импульсов количество составляющих диаграмм может быстро увеличиваться, и человеческая ошибка становится весьма вероятной при попытке записать все диаграммы. В настоящее время разработан автоматический генератор диаграмм, который генерирует все диаграммы Фейнмана, необходимые для вычисления нелинейной поляризации любого *n*-го порядка и определения спектроскопического сигнала. Хотя генератор диаграмм можно использовать для автоматизации вычислений в случае импульсного приближения, его наибольшая сила заключается в автоматизации расчетов нелинейной поляризации, когда важно перекрытие импульсов. Например, нестационарная абсорбционная спектроскопия описывается в теории возмущений третьего порядка, а 2D-спектроскопия экситон-экситонного взаимодействия описывается в теории возмущений пятого порядка. В нестационарной абсорбционной спектроскопии нелинейная поляризация описывается шестью или семью диаграммами в 2D-спектроскопии в импульсном пределе, но 16 или 240 диаграмм, соответственно, при перекрывании импульсов во времени. Автоматический генератор диаграмм позволяет пользователям автоматически включать все соответствующие диаграммы при относительно низких вычислительных затратах.

Геометрия двухимпульсного эксперимента в нелинейно-оптической спектроскопии показана на рисунке 2 [5–10]. Два импульса с волновыми векторами k_1 и k_2 со временем задержки τ возбуждают образец. На рисунке показаны направления сигнального вектора k, соответствующего 4-волновому смешению относящегося к $P^{(3)}$ члену разложения в выражении для нелинейной поляризации и следующему члену 6-волнового смешения, относящегося к $P^{(5)}$ члену разложения. Амплитуда сигнала 6-волнового смешения мала по сравнению с сигналом 6-волнового смешения как следующий член ряда разложения.



Рис. 2. Четырехволновое смешение. Двухимпульсный эксперимент. Нелинейная поляризация $P^{(3)}$, направление сигнальной волны k: $k = k_1 + k_2 - k_2$, $k = k_2 + k_1 - k_1$, $k = 2k_1 - k_2$, $k = 2k_2 - k_1$. 6-волновое смешение, нелинейная поляризация $P^{(5)}$, направление сигнальной волны k: $k = 3k_2 - 2k_1$, $k = 3k_1 - 2k_2$

Геометрия трехимпульсного эксперимента показана на рисунке 3 [7, 10– 13]. Появление сигнального импульса k можно интерпретировать в формализме нелинейно-оптического отклика $P^{(3)}$ как затухание свободной индукции. Альтернативным для генерации сигнального импульса является дифракция пробного импульса на дифракционной решетке, наведенной в образце в силу интерференции двух пучков накачки k_1 и k_3 . Пробный пучок k_2 дифрагирует на этой решетке в направлении k.



Рис. 3. Четырехволновое смешение. Геометрия трехимпульсного эксперимента, boxcarsсхема. Импульсы с волновыми векторами k_1 и k_3 — импульсы накачки. Импульс k_2 — пробный, k — сигнальный

Фемтосекундная спектроскопия возбуждение-зондирование

Двухимпульсный эксперимент [3, 14–17]. Спектроскопия возбуждениезондирование. Эта методика соответствует геометрии фазового синхронизма $k = k_2 + k_1 - k_1$, где является импульсом накачки, а импульс k_2 — пробным импульсом (см. рис. 3). В эксперименте измеряется дифференциальный сигнал оптической плотности (поглощения) ΔA или, соответственно, дифференциального пропускания ΔT :

$$\Delta A(\boldsymbol{\omega}_2, \tau) = -2 \cdot \boldsymbol{\omega}_2 \cdot \frac{\mathrm{Im} \left[E_2^*(\boldsymbol{\omega}_2) \cdot \boldsymbol{P}^{(3)}(\boldsymbol{\omega}_2, \tau) \right]}{\left| E_2(\boldsymbol{\omega}_2) \right|^2} = A(\boldsymbol{\omega}_2, \tau) - A(\boldsymbol{\omega}_2, -\infty),$$

где $A(\omega_2, \tau)$ — поглощение в момент времени задержки τ , на пробной частоте ω_2 ; $A(\omega_2, -\infty)$ — поглощение до импульса возбуждения, на пробной частоте ω_2 .

Поляризация $P^{(3)}$ и дифференциальное поглощение ΔA содержат члены, соответствующие выцветанию (bleach, BL), связанному с обеднением заселенности основного состояния в результате возбуждения, вынужденному излучению (stimulated emission, SE) и поглощению в вышележащие состояния (excited state absorption, ESA) [3]. При задержке $\tau \sim 0$, когда пробный и возбуждающий импульсы перекрываются во времени, возникает дополнительный сигнал — когерентный артефакт, который обычно при анализе спектрально-кинетических данных не учитывается. Минимальная модельная схема квантовых уровней для описания дифференциального поглощения ΔA включает три уровня (рис. 4).



Рис. 4. Трехуровневая схема. Минимальная схема Яблонского для описания дифференциального поглощения фемтосекундного эксперимента поглощение-зондирование

В простейшей трехуровневой схеме сигнал BL и сигнал SE совпадают и пропорциональны дипольному моменту в четвертой степени μ_{10}^4 . Сигнал ESA пропорционален $\mu_{10}^2 \mu_{12}^2$. Диаграммы Фейнмана, соответствующие выцветанию (bleach, BL), связанному с обеднением заселенности основного состояния в результате возбуждения, вынужденному излучению (stimulated emission, SE) и поглощению в вышележащие состояния (excited state absorption, ESA) показаны на рисунке 5.

В молекулярной системе, вследствие колебательной релаксации возбужденного электронного состояния $|1\rangle$, сигнал BL и сигнал SE отличаются (длинноволновый сдвиг Стокса). Полоса BL по форме совпадает с полосой поглощения из основного состояния, но в дифференциальном спектре проявляется с отрицательным знаком.

Широкополосная фемтосекундная спектроскопия возбуждение-зондирование. В этом методе пробным импульсом является широкополосный импульс белого суперконтинуума (рис. 6, 7). Это один из наиболее широко используемых методов фемтосекундной спектроскопии, так как позволяет выявить динамику дифференциальных спектров исследуемой системы в широком диапазоне [6, 15, 19–25].

Задержка между импульсами возбуждения и зондирования определяется разностью оптического пути между обоими каналами с позиционированием ли-

нии задержки шаговым двигателем с точностью ~ 0,2–0,5 мкм, что близко по порядку величины длине волны видимого диапазона света ~ $\lambda/2 - \lambda$. Этой точности достаточно для экспериментов по схеме возбуждение-зондирование. Длительность импульсов в обоих каналах, их спектральный состав могут контролируемо меняться за счет их преобразования нелинейно оптическими методами. Фотоиндуцированное импульсом накачки изменение поглощения в образце регистрируется как дифференциальное поглощение с помощью монохроматора и CCD-камеры.



Рис. 5. Диаграммы Фейнмана, соответствующие выцветанию (bleach, BL), связанному с обеднением заселенности основного состояния в результате возбуждения, вынужденному излучению (stimulated emission, SE) и поглощению в вышележащие состояния (excited state absorption, ESA) [18]



Рис. 6. Молекулярная трехуровневая схема Яблонского с учетом колебательных уровней. Показаны сигналы ESA, BL, SE в момент времени задержки, когда внутримолекулярная колебательная релаксация внесла существенный вклад в сигнал SE



Рис. 7. Временная последовательность импульсов возбуждения и зондирования. Схема экспериментальной установки широкополосной фемтосекундной спектроскопии возбуждение-зондирование

Излучение белого суперконтинуума формируется в прозрачном диэлектрике, например, в воде, стекле, кристалле сапфира или фторида кальция и т. п., при воздействии интенсивного, сфокусированного фемтосекундного импульса. Образование белого суперконтинуума связывают с эффектами самофокусировки и фазовой самомодуляции фемтосекундного импульса в оптически прозрачном диэлектрике. Для возбуждения белого суперконтинуума используются фемтосекундные импульсы фундаментальной гармоники Ti³⁺ сапфирового лазера. На рисунке 8 показан типичный спектр белого суперконтинуума, генерируемого в воде.

Спектр суперконтинуума обычно чирпирован [19]. В первом приближении чирп импульса суперконтинуума можно представить в виде линейного чирпа:

$$E_{2}(t) \sim \exp\left[-\frac{t^{2}}{2\tau_{2}^{2}} + i\left(\Omega_{2}t + \beta t^{2}\right)\right],$$
$$E_{2}(\omega) \sim \tau_{2}\sqrt{\frac{2\pi}{\alpha}}\exp\left[-\tau_{2}^{2}\frac{(\omega_{2}-\Omega_{2})^{2}}{2\alpha}\right],$$

В. А. Надточенко, А. В. Айбуш Методы фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании процессов... 177



Рис. 8. а) Спектр белого суперконтинуума, генерируемого в воде фемтосекундным лазерным импульсом с длиной волны генерации около 800 нм. (б) Спектр лазерного импульса, используемого для генерации белого суперконтинуума

где Ω₂, τ₂ и β являются центральной частотой импульса суперконтинуума, длительностью импульса и скоростью чирпирования. Соответственно, *α* = 1 --2 *і* $\beta \tau_2^2$. Чирпирование импульса суперконтинуума означает, что в момент времени *t* частота пробного импульса равна $\Omega_2(t) = \Omega_2 + 2\beta t$, т. е. пробная частота зависит от времени. Так как нулевым моментом t_0 в методе возбуждениезондирование является момент совпадения импульса возбуждения и пробного импульса, то зависимость пробной частоты чирпированного суперконтинуума $\Omega_2(t)$ от времени означает зависимость нулевого момента $t_0(\omega_2)$ от частоты. Функция нулевого момента времени $t_0(\omega_2)$ для случая линейного чирпа суперконтинуума выражается как $t_0(\omega_2) \sim (\omega_2 - \Omega_2)/\beta$. На практике при использовании широкополосного суперконтинуума от ближнего УФ-диапазона до ближнего ИК-диапазона линейное приближение чирпа является недостаточно точным, и функция нулевого момента $t_0(\omega_2)$ аппроксимируется полиномом второй или более высокой степени. Функцию нулевого момента $t_0(\omega_2)$ экспериментально можно определить из первичных данных по времени появления лазерного артефакта на выбранной частоте (длине волны), как это показано на рисунке 9. Появление лазерного артефакта означает совпадение во времени импульса накачки и соответствующей спектральной компоненты пробного импульса белого континуума $\Omega_2(t)$. По измеренной функции $t_0(\omega_2)$ проводится коррекция временной задержки во всем спектральном диапазоне (рис. 9).



Рис. 9. Функция нулевого момента $t_0(\omega_2)$. Возбуждение коллоида квантовых точек CdSe на длине волны 360 нм. Растворитель — вода. (а) Положение нулевого момента $t_0(\omega_2)$ -когерентного артефакта как функция длины волны и времени. (б) Экспериментальные данные после коррекции времени задержки на положение нулевого момента $t_0(\omega_2)$

После коррекции первичных данных на функцию нулевого момента времени $t_0(\omega_2)$ дифференциальный спектр $\Delta A(\lambda, t)$ приобретает вид, показанный на рисунке 10.

Метод возбуждение-зондирование остается одним из наиболее часто используемых методов фемтосекундной спектроскопии благодаря относительной простоте его реализации. Метод обеспечивает высокое временное разрешение, которое определяется длительностью импульса возбуждения и может составлять 5 фемтосекунд. Использование белого континуума в качестве пробного импульса обеспечивает обзор дифференциального спектра в исключительно широком спектральном диапазоне, что позволяет выявлять в одном эксперименте динамику различных возбужденных состояний и/или интермедиатов. Спектральная подстройка несущей частоты импульса возбуждения дает возможность подстраивать в желаемый диапазон возбуждения в случае систем сложного состава. С использованием этого метода выполнены многочисленные эксперименты по исследованию динамики возбужденных состояний в таких

В. А. Надточенко, А. В. Айбуш Методы фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании процессов... 179



Рис. 10. Дифференциальные спектры $\Delta A(\lambda, t)$, полученные методом широкополосной фемтосекундной спектроскопии возбуждение-зондирование после возбуждения фотосистемы 1 импульсом длительностью 20 фс, с длиной волны 720 нм, энергией 20 нДж

биофизических объектах, как фотосинтез, зрительные родопсины, ретинальсодержащие белки и т. д. [6, 21, 23, 26-44]. Однако этот метод имеет фундаментальное ограничение, вытекающее из принципа неопределенности Гейзенберга. — высокое временное разрешение, короткий импульс накачки определяет широкий спектр импульса возбуждения. Это ограничение не имеет принципиального значения, если речь идет о ретинальсодержащих белках, так как возбуждается только один пигмент. Но это ограничение имеет важное значение, когда исследуются фотосинтетические центры. В характерных полосах поглощения фотособирающих антенн и реакционных центров пики поглощения хлорофиллов сдвинуты относительно друг друга на небольшие значения длин волн. Короткий, но широкий импульс возбуждения поглощается группой хлорофиллов, что может приводить к сложностям в интерпретации экспериментальных данных [6]. Частично эта проблема разрешается спектральной настройкой импульса возбуждения, например, настройкой пика возбуждения на красный край Qy полосы фотосистемы, так, чтобы хлорофиллы первичного донора поглощали свет возбуждения преимущественно относительно хлорофиллов антенны. Дополнительную возможность представляет широкополосное зондирование: исследуя динамику спектров в широком диапазоне с использованием методов глобального анализа, удается выявлять спектры и динамику интермедиатов. Важную роль играет сравнительное исследование динамики спектров фотосистем с точечными мутациями. Но фундаментальное ограничение принципа неопределенности остается существенной проблемой в исследовании динамики возбужденных состояний в сложных системах с неоднородно уширенными полосами поглощения.

Спектроскопия квантовых биений, квантовая когерентность, волновой пакет. При накачке молекулярной системы спектрально широким фемтосекундным импульсом (рис. 11) возбуждаются все оптические переходы с ненулевым дипольным моментом, попадающим в спектральный диапазон импульса возбуждения. Возбуждение широкополосным импульсом накачки приводит к возникновению квантовой когерентности в исследуемой системе. В формализме матрицы плотности квантовая когерентность соответствует ненулевым недиагональным членам матрицы плотности [3, 45]. Минимальная схема для объяснения квантовой когерентности представлена на рисунке 12. Диаграммы Фейнмана нелинейной поляризации $P^{(3)}$, соответствующие вынужденному излучению, выцветанию и квантовым биениям, показаны на рисунке 13.



Рис. 11. Длительность импульса Δt и спектральная ширина $\Delta \omega$ для спектрально-ограниченного фемтосекундного импульса $\Delta t \cdot \Delta \omega \sim 1$



Рис. 12. Минимальная схема Яблонского, объясняющая возможность появления квантовых биений в фемтосекундном эксперименте


Рис. 13. Диаграммы Фейнмана нелинейной поляризации $P^{(3)}$, соответствующие вынужденному излучению, выцветанию и квантовым биениям

В выражении для нелинейной поляризации $P^{(3)}$ появится дополнительный член, который на диаграмме Фейнмана отмечен как квантовые биения (quantum beat) и вносит в выражение для поляризации осциллирующий член с частотой $\omega = (\varepsilon_1 - \varepsilon_{1'})/\hbar$:

$$-\frac{i}{\hbar^3} \cdot 2\mu_{10}^2 \mu_{10}^2 \left(e^{-i\frac{\varepsilon_{\Gamma}-\varepsilon_1}{\hbar}t_2} \cdot e^{-i\frac{\varepsilon_{\Gamma}-\varepsilon_0}{\hbar}t_3} + e^{+i\frac{\varepsilon_{\Gamma}-\varepsilon_1}{\hbar}t_2} \cdot e^{-i\frac{\varepsilon_{\Gamma}-\varepsilon_0}{\hbar}t_3} \right) e^{-\Gamma t_3}$$

В молекулярной системе возможна квантовая когерентность, признаком которой являются квантовые биения, относящаяся как к электронным степеням свободы, так и к молекулярным степеням свободы. Возбуждение фемтосекундным импульсом может приводить к квантовой когерентности для группы состояний. Для электронной когерентности характерно быстрое затухание во временной шкале порядка десятков фемтосекунд. Быстрое затухание электронной когерентности объясняют относительно сильным характером электроэлектронных взаимодействий. Колебательные степени свободы сохраняют когерентность на протяжении сотен фемтосекунд – нескольких пикосекунд. Когерентность группы колебательных состояний описывают в терминах когерентного колебательного волнового пакета (рис. 14).

Фемтосекундные лазерные импульсы могут генерировать колебательные сигналы в дифференциальном поглощении $\Delta A(\lambda, t)$. Квантовые биения часто изучаются с помощью фемтосекундных спектров когерентности (femtosecond coherent spectra, FCS), Фурье-преобразование позволяет определить спектр

мощности осцилляций, амплитуды в Фурье-активной области спектра, профили фазы для отдельных частот колебаний [46]. В принципе, можно выявить механизм, который вызывает каждый сигнал квантовых биений, сравнивая измеренные спектры FCS с теми, которые проистекают из микроскопических моделей. Однако распространенная модель гармонического осциллятора часто оказывается недостаточной для описания измеряемых FCS-спектров. Разрабатываются теоретические квантово-механические модели, с которыми можно сравнивать измеренные спектры FCS [46]. Это модели гармонических потенциалов с учетом эффекта ангармонических потенциалов и эффекта электронной когерентности в случае димера. Эти теоретические модели FCS представляют значительный интерес для выявления электронных когерентностей, которые могут возникнуть при измерениях молекулярных агрегатов, включая фотосинтетические белки.



Рис. 14. Качественное представление возбуждения когерентного колебательного волнового пакета, возбуждаемого фемтосекундным импульсом

Фемтосекундная импульс-стимулированная спектроскопия комбинационного рассеяния (Impulse Stimulated Raman Spectroscopy — ISRS) [19, 47–52]. Фемтосекундная спектроскопия ISRS — метод детектирования спектров комбинационного рассеяния во временном домене в противоположность регистрации комбинационного рассеяния в спектральном домене. ISRS можно рассматривать как одно из направлений спектроскопии FCS. Короткий фемтосекундный импульс, ширина полосы которого превышает интервал колебательной энергии, создает колебательный волновой пакет, который развивается со временем. Полученное нестационарное состояние можно исследовать, записав осцилляционные изменения показателя преломления или электронных спектров на частоте импульсно-возбужденного колебания, которые проявляются в сигнале $\Delta A(\lambda, t)$ [30–32]. В качестве примера спектроскопии ISRS рисунок 15 демонст-

В. А. Надточенко, А. В. Айбуш Методы фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании процессов... 183

рирует кинетические кривые стимулированной люминесценции, выцветания и поглощения дифференциального поглощения зрительного родопсина $\Delta A(\lambda, t)$ после возбуждения фемтосекундным импульсом в полосу поглощения α ($\lambda_{max} =$ = 498 нм). Измерения были выполнены по методу возбуждение-зондирование с использованием в качестве пробного импульса белого суперконтинуума, как это описано выше. Рисунок 16 показывает спектры мощности Фурье-преобразования кинетических кривых $\Delta A(\lambda, t)$, в которых можно наблюдать выраженные пики, соответствующие пикам комбинационного рассеяния ретиналя. Этот пример показывает, что ISRS-спектроскопия позволяет выявить низкочастотные колебательные моды молекулы 0–500 см⁻¹, т. е. моды в спектральном диапазоне, труднодоступном традиционному методу комбинационного рассеяния, для которого более характерен диапазон «отпечатков пальцев» 500–1800 см⁻¹. Рисунок 17 показывает схему поверхности потенциальной энергии (ППЭ) реакции изомеризации ретиналя в зрительном родопсине. Показано положение колебательного волнового пакета на ППЭ.



Рис. 15. (а) Кинетические кривые ф/и-поглощения родопсина, полученные при возбуждении импульсами 500 нм и представленные в диапазоне зондирования 580–700 нм с шагом 10 нм на временах до 0,8 пс. (б) Кинетические кривые ф/и-поглощения родопсина, полученные при возбуждении импульсами 500 нм и представленные в диапазоне зондирования 430–480 нм с шагом 5 нм на временах до 0,8 пс

Пример кинетических кривых коллоида квантовых точек CdSe в толуоле демонстрирует возможности спектроскопии ISRS, которые не реализуются методами Рамановской спектроскопии в частотном домене [25]. В кинетических кривых наблюдаются осциллирующие компоненты (рис. 18). Осциллирующие компоненты выявляются как невязки при фитинге кинетических кривых.



Рис. 16. Спектры мощности Фурье-компонент, полученные при анализе осцилляций сигналов $\Delta A(t)$ родопсина в интервале времен задержки 0,09–1 пс в диапазоне частот 0–500 см⁻¹ на длинах волн зондирования 440–480 нм (а) и 560–620 нм (б)



Рис. 17. Схема ППЭ реакции изомеризации ретиналя в зрительном родопсине. Показано положение колебательного волнового пакета на ППЭ



рье-преобразования невязки на рисунке (в). Пики 0,55 ТГц — продольный акустический фонон, 6,15 ТГц — LO-фонон, 15,6 и 23,6 ТГц — осцилляции колебательного волнового пакета в толуоле. (д) 3-мерное представление амплитуды осцилляций **Рис. 18.** (а) Кинетическая кривая CdSe на длине волны 567 нм. Плотность энергии возбуждения 0,064 мДж/см². (б) Спектр мощности Фурье-преобразования невязки на рисунке (а). Пик 6,16 ТГц соответствует продольному оптическому фонону LO. (в) Кинетическая кривая CdSe на длине волны 567 нм. Плотность энергии возбуждения 1,84 мДж/см². Спектр мощности Фукак функции пробной длины волны в квантовых точках CdSe

В спектрах мощности Фурье-преобразования осциллирующих кривых можно обнаружить колебательные пики, которые относятся к оптическому продольному фонону $\sim 6,16$ ТГц (~ 205 см⁻¹) и акустическому продольному фонону 0,55 ТГц (18,7 см⁻¹) в квантовых точках CdSe. Помимо этого, можно наблюдать рамановские полосы, относящиеся к растворителю (толуолу) — 15,6 ТГц (520 см⁻¹) и 23,6 ТГц (787 см⁻¹). В представлении спектров мощности Фурье-преобразования как функции длины волны λ пробного импульса можно наблюдать пики (рис. 18, ∂), которые по своему положению соответствуют спектральной области экситонных пиков CdSe, что и позволяет отнести наблюдаемые осцилляции к квантовым точкам.

Дополнительную информацию об осцилляциях в ISRS-сигналах можно получить из анализа временной эволюции преобразования Фурье. С использованием вейвлет-преобразования осциллирующей компоненты кинетической кривой определяются зависимость частоты и амплитуды осцилляций от времени. Рисунок 19, а качественно показывает, что положение частоты рамановского пика и его амплитуды меняется во времени. Рисунок 19, б показывает, что на коротких временах задержки до 200 фс частота колебания оптического фотона плохо определена и меняется во времени. Рисунок 19, б показывает спад во времени амплитуды осцилляций оптического фонона. При аппроксимации спада амплитуды экспонентой невязка выявляет модуляцию амплитуды. Фурье-преобразование невязки показывает пик 0,58 ТГц (19 см⁻¹), который совпадает с пиком акустического фонона. Таким образом, анализ ISRS-сигнала позволяет выявить нелинейное взаимодействие между оптическим и акустическим фононами, характерное время затухания оптического фонона и начальный переходный процесс формирования колебаний оптического фонона, когда квантовая интерференция между состояниями генерируется фемтосекундным возбуждением.



Рис. 19. (а) Частоты и амплитуды осцилляций в квантовых точках CdSe как функция времени. Осцилляции оптического фонона выделены желтым. (б) Спад амплитуды осцилляций оптического фонона. Синяя линия — экспоненциальный фитинг, характерное время затухания $1,8 \pm 0,2$ пс. (в) Спектр мощности Фурье-преобразования невязки, показанной на (б)

В. А. Надточенко, А. В. Айбуш Методы фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании процессов... 187

Фемтосекундная лазерная спектроскопия возбуждение-зондирование с использованием активирующего импульса. Дополнение методики возбуждениезондирование третьим импульсом — активирующим (actinic) импульсом позволяет исследовать фемтосекундную динамику интермедиатов (первичных продуктов реакции, возбужденных состояний), которые возникают под действием активирующего импульса. На рисунке 20 [28, 32, 33, 50, 53-55] показана временная последовательность фемтосекундных импульсов. Задержка по времени Т определяет интермедиат, который возникает после активирующего импульса. Последовательность импульсов возбуждение-зондирование, следующих с задержкой по времени т, дает возможность исследовать фемтосекундную спектроскопию интермедиата. Примером такой методики может служить исследование фотохромизма зрительного родопсина [28, 32, 33]. В дифференциальных спектрах зрительного родопсина (рис. 21) после возбуждения фемтосекундным импульсом выделяются полосы поглощения основного состояния Р₄₉₈, первичных продуктов изомеризации Фото570 и Бато535. Активирующий импульс I инициирует фотохимическую реакцию изомеризации. Фемтосекундный импульс возбуждает колебательный волновой пакет в S₁-состоянии (рис. 22). После прохождения части колебательного волнового пакета через коническое пересечение CI образуются первичные продукты изомеризации, обозначаемые как Фото₅₇₀ и Бато₅₃₅. Не прошедшая часть волнового колебательного пакета через СІ попадает в долину начального состояния. В долине продуктов колебательный волновой пакет сохраняется, что проявляется как осциллирующие компоненты в кинетических кривых.



Рис. 20. Временная диаграмма последовательности импульсов в фемтосекундной лазерной спектроскопии с использованием активирующего импульса (actinic)

Колебательный волновой пакет, образованный активирующим импульсом I на поверхности S₁, через приблизительно ~ 100 фс достигает конического пересечения CI. В долине ППЭ первичного интермедиата Фото₅₇₀ на временах 0,1–2 пс происходит движение этого пакета. Первичный интермедиат Фото₅₇₀ переходит в Батородопсин за характерное время ~ 2–3 пс. Импульсом II в полосе поглощения Фото₅₇₀ с длиной волны 620 нм с задержкой T = 0,2–2 пс будет



Рис. 21. Дифференциальные спектры поглощения зрительного родопсина после возбуждения 20 фс импульсом на длине волны 498 нм. На вставке показаны спектры P_{498} , Фото₅₇₀ и Бато₅₃₅



Рис. 22. Слева — схема ППЭ. Показаны две, в качестве примера, спектральные настройки импульса зондирования относительно положения колебательного волнового пакета на поверхности продукта изомеризации. Справа (красным, левая *y*-ось) — кинетическая кривая $\Delta A(\lambda, t)$ на длине волны зондирования $\lambda = 570$ нм. Справа (синим, правая *y*-ось) — кинетическая кривая изменения поглощения $\Delta \Delta A$ ($\lambda = 570$ нм, T) как функция временной задержки *T* между активирующим первым импульсом I и вторым импульсом II накачки $\lambda = 620$ нм

В. А. Надточенко, А. В. Айбуш Методы фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании процессов... 189

индуцировать $S_1 \leftarrow S_0$ переход из Фото₅₇₀, на правую ветвь $S_1 ППЭ$. Это приведет к обратной реакции с переходом Фото₅₇₀-S₀ в основное состояние родопсина. Обратная реакция является причиной падения следующего долгоживущего интермедиата Батородопсина спектр поглощения которого хорошо детектируется на времени задержки $\tau = 100$ пс. В дифференциальном спектре произойдет уменьшение амплитуды поглощения Батородопсина — $\Delta\Delta A$. Амплитуда $\Delta\Delta A$ зависит от времени задержки Т (рис. 22) и в этой зависимости проявляется осцилляционная компонента, которая коррелирует с осцилляциями в кинетической кривой $\Delta A(\lambda, t)$, обусловленными движением колебательного волнового пакета по долине ППЭ области первичного интермедиата Фото₅₇₀. Так как амплитуда $\Delta\Delta A$, отражающая вероятность обратной реакции, прямо пропорциональна поглощению энергии импульса II, то, как видно из рисунка 22, в момент положения колебательного волнового пакета, обеспечивающего максимум поглощения в кинетике $\Delta A(\lambda, t)$ Фото₅₇₀, происходит максимальное уменьшение ΔA и наблюдается максимальный спад амплитуды сигнала Батородопсина. Если задержка импульса II будет 2-4 пс, то обратная фотореакция будет инициироваться из продукта Бато535. Это качественное объяснение наблюдаемого фотохромизма. Аналогичные эксперименты с активирующим импульсом были проведены и с ретиналь-содержащими белками бактериородопсинов различного происхождения. На ранних временах задержки были выявлены обратные фотохромные реакции перехода из состояний первичных интермедиатов в основное состояние.

Методом фемтосекундной лазерной спектроскопии с активирующим импульсом изучены фотохромные реакции изомеризации ретиналя в родопсине животных (II типа) — зрительном родопсине быка, и в микробиальных родопсинах (I типа) — родопсине *Exiguobacterium sibiricum* и бактериородопсине *Halobacterium salinarum*. Показано, что элементарный акт фотореакции изомеризации ретиналя в родопсинах I и II типов можно интерпретировать как переход через коническое пересечение с сохранением когерентности колебательных волновых пакетов, образующихся при возбуждении. В родопсинах I типа реакция образования первичных интермедиатов протекает быстрее, чем в родопсинах II типа. Это связано с осоенностями строения S₁ ППЭ, что, в свою очередь, может быть связано как с различиями исходных изомерных форм их хромофоров (полностью-*транс* и 11-*цис* ретиналь соответственно), так и с влиянием белкового окружения на хромофор.

Несмотря на практически одинаковые значения квантовых выходов прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина, обратная фотореакция зрительного родопсина гораздо менее эффективна ($\varphi = 0,15$), чем в случае бактериородопсина ($\varphi = 0,81$). Можно предположить, что фотобиологический механизм преобразования света в информационный процесс в эволюционно

более «молодых» зрительных родопсинах (родопсины II типа) должен быть надежнее, нежели механизм преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более «древних» микробиальных родопсинах (родопсины I типа). Низкое значение квантового выхода обратной реакции зрительного родопсина можно рассматривать как повышение надежности прямой реакции, запускающей процесс фототрансдукции.

Детектирование возбужденного состояния или интермедиатов, образующихся после активирующего импульса, можно осуществить методами спектроскопии комбинационного рассеяния. Спектр комбинационного рассеяния регистрируется во временном домене по методу ISRS. После активирующего импульса через время задержки T следует фемтосекундный импульс накачки, пробные импульсы белого континуума следуют через варьируемое время задержки τ . Спектр комбинационного рассеяния возбужденного состояния или интермедиата получают через Фурье-преобразование осциллирующей компоненты в сигнале $\Delta A(\lambda, \tau)$. Через изменения задержки T готовится определенное возбужденное состояние или интермедиат.

Фемтосекундная спектроскопия вынужденного комбинационного рассеяния (femtosecond stimulated Raman scattering, FSRS) [47, 48, 50, 53–62]. Для этого метода требуются три лазерных импульса (рис. 23): (1) 20–150-фемтосекундный возбуждающий импульс (actinic), который переводит образец в возбужденное электронное состояние; (2) спектрально узкий импульс накачки с длительностью ~ 3–8 пикосекунды (probe), инициирующий вынужденный рамановский переход; и (3) широкополосный пробный импульс длительностью ~ 5–100 фс (Raman). В фемтосекундной стимулированной спектроскопии комбинационного рассеяния происходит усиление на комбинационных резонансах, т. е. на длинах волн, оптическая частота которых отличается от частоты накачки (probe) на величину, которая соответствует комбинационным активным колебаниям молекулы в образце.

Фемтосекундная спектроскопия стимулированного комбинационного рассеяния позволяет получить информацию о структурных изменениях в реагирующих системах с высокими временным (~ 50 фс) и спектральным разрешением (~ 10 см⁻¹). Важной возможностью FSRS является распутывание временного и спектрально-энергетического разрешения, так как в основе метода лежит спектральный анализ широкополосных фемтосекундных импульсов. Мониторинг вибрационных структурных, а не электронных характеристик как функции времени имеет важное значение для анализа динамики химических и биохимических реакций. Многомерные реализации FSRS могут предоставить большой объем информации по динамике сольватации, колебательной связи и структурным изменениям на фемтосекундной шкале времени.



Рис. 23. Временная последовательность импульсов в методике вынужденного комбинационного рассеяния. Оптические переходы, характерные для метода временной разрешенной фемтосекундной спектроскопии комбинационного рассеяния возбужденных состояний или интермедиатов

Колебательная спектроскопия с временным разрешением традиционно ограничивалась пикосекундной временной областью, как в обычных конфигурациях накачка-зондирование, так и в нелинейных реализациях, таких как когерентная антистоксова спектроскопия комбинационного рассеяния (КАРС) [47, 48, 50, 57, 59, 63–66]. Варианты комбинационного рассеяния с временным разрешением появились в форме импульсного вынужденного комбинационного рассеяния (ISRS). Преимуществом ISRS является высокое временное разрешение, но ISRS страдает от плохого отношения сигнал/шум в хорошо изученной частотной области «отпечатков пальцев» выше $\gtrsim 500~{\rm cm}^{-1}$ и лучше всего работает с низкочастотными модами < 500 см⁻¹. Появление в последнее время фемтосекундных импульсов в ИК-диапазоне произвело революцию в области ИКспектроскопии с временным разрешением за счет появления как традиционных экспериментов накачкой-зондированием, так и экспериментов с применением многомерных методов, основанных на колебательных эхо-сигналах. Несмотря на огромный успех этих методов, временное разрешение, частотный диапазон и доступная полоса пропускания ИК-спектроскопии остаются ограниченными. Как следствие, прямое наблюдение в реальном времени структурных измене-

ний, связанных с динамикой химических реакций, остается труднодостижимой задачей. Фемтосекундная спектроскопия стимулированного комбинационного рассеяния света (FSRS) обеспечивает значительный прогресс в измерении структурных химических изменений в реальном времени. Подход FSRS позволяет регистрировать колебательную структуру с временным разрешением, сравнимым или более быстрым, чем периоды колебаний исследуемых движений ядер. В FSRS одновременное взаимодействие узкополосного пикосекундного импульса пробного и широкополосного континуума фемтосекундного рамановского импульса приводит к разрешенному колебательному спектру. Принципиальная особенность метода FSRS состоит в том, что высокое временное разрешение не приводит к потере спектрального-энергетического разрешения. Широкополосный фемтосекундный импульс — в присутствии пикосекундного импульса комбинационного рассеяния, который обеспечивает фоновое поле в стимулированном рамановском процессе, — создает макроскопическую поляризацию с высоким временным разрешением, тогда как регистрация без временного разрешения разложенного на полихроматоре спектра обеспечивает высокое спектрально-энергетическое разрешение.

Двухимпульсное фотонное эхо. Сигнал 4-волнового смешения в направлении $2k_2 - k_1$ соответствует фотонному эхо (рис. 24). Две существенные особенности характерны для этого сигнала: (1) в диаграмме Фейнмана два взаимодействия связаны с пробным импульсом k_2 ; (2) направление распространения сигнала отличается от направления пробного импульса и измеряется гомодинированный сигнал $|P^{(3)}|^2$, тогда как в случае спектроскопии возбуждение-зондирование измеряется гетеродинированный сигнал 2 Im($E P^{(3)}$) [3].



Рис. 24. Фотонное эхо в двухимпульсном эксперименте. Фейнмановские диаграммы процесса 4-волнового смешения $2k_2 - k_1$

Двумерная фемтосекундная спектроскопия. Основной принцип 2-мерной спектроскопии демонстрируется на рис. 25 [67–77]. Дифференциальный спектр поглощения регистрируется как функция энергии (частоты) возбуждения. Если в системе имеется два не связанных перехода 0–1 и 0–2, например две не взаимодействующие молекулы, как показано на рисунке 25, *a*, то в дифференциальном спектре поглощения на частоте перехода 0–1 появится отрицательный пик,

который будет суммой пика выцветания (BL) и стимулированного излучения (SE), интенсивность которого будет пропорциональна ~ $2|\mu_{01}|^2$. На частоте второго перехода появится отрицательный пик, амплитуда которого определяется BL и SE ~ $2|\mu_{02}|^2$. Оба пика находятся на диагонали 2D-представления. Форма зависит от параметров однородного и неоднородного уширения. Если система описывается 3-уровневой схемой взаимосвязанных переходов, как показано на рисунке 25, δ , то в этом случае возбуждение уровня 1 сопровождается появлением в дифференциальном спектре полосы выцветания 2' на частоте перехода в состояние 2. Амплитуда этого пика определяется только BL и амплитуда пропорциональна ~ $|\mu_{02}|^2$. Аналогично, на частоте возбуждения состояния 2, проявится пик 1' BL перехода 0–1 с амплитудой ~ $|\mu_{01}|^2$. Кросс-пики 1' и 2' указывают на взаимосвязь обоих переходов. Таким образом простейшие двумерные (2D) спектры позволяют установить связь между переходами в системе.



Рис. 25. 2D-спектроскопия: (а) двумерный дифференциальный спектр двух не взаимодействующих молекул; (б) двумерный спектр трехуровневой схемы переходов, соответствующих одной молекуле, или двух связанных переходов

Любое спектроскопическое измерение, отображаемое как функция двух переменных, представляет собой в общем смысле двумерный спектр. Перестройка частоты (длины волны) импульса возбуждения в методике фемтосекундной спектроскопии возбуждение-зондирование и построение 2D-карт сигнала дифференциального поглощения для каждого времени задержки между импульсами возбуждения и зондирования будет означать последовательность двумерных спектров как функцию времени задержки. Такая постановка эксперимента возможна, но требует большого количества сканов и, главное, не решает проблемы ограничения спектрального и временного разрешения в силу принципа неопределенности. Высокое временное разрешение влечет требование короткого импульса возбуждения и, следовательно, широкого спектра.

Разъединение временного и спектрального разрешения достигается с использованием техники Фурье-спектроскопии. Этот подход нашел широкое применение и термин «2D-спектроскопия» в настоящее время используется для обозначения 2D Фурье-спектроскопии (2D FT). Аналогом техники разъединения временного и спектрального разрешения может служить метод стробоскопической регистрации сигнала. Реализация методов 2D FT спектроскопии разнообразна и этому вопросу посвящены обзорные статьи [72, 78-81]. В эксперименте 2D FT спектроскопии образец возбуждается тремя импульсами. Возможно также использование вспомогательного четвертого импульса — local oscillator (LO), который интерферирует с сигнальным импульсом, но этот вопрос выходит за рамки настоящей статьи. Временная последовательность трех импульсов показана на рисунке 26. Направление вектора сигнального импульса определяется условием фазового синхронизма (см. рис. 26). Электрическое поле когерентно-сгенерированного сигнала записывается на протяжении многих прогонов как функция двух временных переменных: задержки τ между импульсами возбуждения и временем t, в течение которого излучается сигнал (см. рис. 26). Время задержки между импульсами возбуждения a и b, обозначаемое как τ , обычно называют временем когерентности. Время задержки между импульсом возбуждения b и пробным импульсом c, обозначаемое как T, называют временем ожидания (waiting time). Время T соответствует времени задержки в методе возбуждение-зондирование. Время задержки между пробным импульсом-сигналом *t* время детектирования. Численное преобразование Фурье по обеим временным переменным t и τ генерирует двумерный спектр $S(\omega_t, \omega_\tau, T)$ как функцию двух оптических частот — частоты возбуждения (преобразование τ) и частоты сигнала (преобразование t). Если $S(\omega_t, \omega_\tau, T)$, спектр получается из двойного Фурьепреобразования сигнального поля по двум переменным t и τ в положительной и отрицательной полуосях времени при фиксированном времени T, то действительная и мнимая части Фурье-преобразования соответствуют дифференциальному поглощению и рефракции. Когда 2DFT-спектры, экспериментально разделенные на реальную поглощающую и мнимую преломляющую части, время разрешения и спектральное разрешение, разъединяются в смысле ограничения по принципу неопределенности.

2D FT-спектр содержит информацию, которой нет ни в одном одномерном спектре. Привлекательность 2D FT-спектроскопии в основном заключается в возможности анализировать сложные ансамбли пигментов. Двумерный спектр можно использовать, чтобы определить связанность двух резонансов, как показано выше. Связанные резонансы создают недиагональные кросс-пики с частотой поглощения одного резонанса и частотой других переходов, тогда как несвязанные резонансы кросс-пики не порождают. Еще одна важная возможность



Рис. 26. Последовательность импульсов в 2D FT спектроскопии. Три неколлинеарных импульса *a*, *b* и *c* в направлении \mathbf{k}_a , \mathbf{k}_b и \mathbf{k}_c генерируют импульс *S* в направлении $\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_c + \mathbf{k}_b - \mathbf{k}_a$. Нулевой момент времени отнесен к моменту времени импульса *c*. В такой нумерации моменты времени прихода импульсов *a* и *b* будут отрицательными t_a и t_b . Интервал времени между импульсами обозначен как $\tau = t_b - t_a$, интервал времени $T = \min(|t_b|, |t_a|)$. 2D-спектр определяется как обратное Фурье-преобразование сигнала *S* по переменным τ и *t*

2D FT-спектроскопии состоит в способности преодолевать неоднородное уширение. В любом спектре полосы резонансных переходов уширены. Часть ширины полосы обусловлена однородным уширением, которое является результатом фундаментальных процессов, присущих каждому участнику ансамбля: спонтанное излучение света, столкновения между атомами, взаимодействия с колебаниями решетки в твердом теле, и т. д. Часть ширины полосы может быть связана с неоднородным уширением, которое возникает из-за различий между участниками ансамбля, таких как доплеровский сдвиг в газе или структурный беспорядок в наноструктуре. В 2D FT-спектроскопии однородное уширение сродни сцеплению резонансов: один и тот же член ансамбля может отвечать за несколько разные частоты поглощения и излучения, поэтому сигнал появляется вне диагонали спектра. Неоднородное уширение, как несвязанные резонансные переходы, не создает недиагональные кросс-пики в 2D FT спектре. Неоднородное уширение определяется вдоль диагонали 2D FT спектра (см. рис. 25), а однородное уширение может быть измерено перпендикулярно диагонали.

Когерентность и фемтосекундная лазерная спектроскопия. Несмотря на известное утверждение Шредингера, что жизнь «теплая, влажная и шумная»

и поэтому адекватно описывается согласно классическим, а не квантовым принципам, недавние эксперименты и теоретическое моделирование показали, что когерентность сохраняется на релевантной (хотя сверхбыстрой) шкале времени даже в условиях беспорядка и шума. Квантовые осцилляции наблюдаются в различных фотофизических и фотохимических процессах биофизических систем, таких как изомеризация ретиналя в родопсинах, бактериородопсинах, иных ретиналь-содержащих белках, в антеннах фотособирающих комплексов фотосинтетических систем, реакционных центрах фотосинтеза и т. д. [41]. Наблюдаемые квантовые осцилляции в фемтосекундных экспериментах являются признаком когерентности, которая может быть связана с колебательными степенями свободы (колебательный волновой пакет) или электронными степенями свободы системы (электронный волновой пакет).

Здесь возникает принципиально важный вопрос: наблюдаемая когерентность присуща исследуемому процессу или является артефактом, обусловленным свойствами возбуждающего импульса? Использование лазера как источника когерентного света всего лишь удобный экспериментальный метод для выявления когерентности процесса или когерентность наблюдаемого процесса обусловлена лазером? Остается открытым вопрос, являются ли квантовая когерентность и молекулярные экситоны, созданные делокализацией возбужденных электронных состояний, существенными чертами механизма, обеспечивающего эффективный захват света и передачу энергии возбуждения на реакционный центр в фотосистемах.

Когерентная сверхбыстрая спектроскопия не дает прямого представления о когерентной динамике, но эксперимент позволяет выявить свойства ансамбля, которые, в свою очередь, говорят нам о лежащем в основе гамильтониане системы. Гамильтониан системы не зависит от условий возбуждения, он одинаков как при естественном, так и при лазерном возбуждении. Измерения когерентности мотивировали теоретические работы над динамикой переноса энергии в промежуточном режиме взаимодействия, когда межмолекулярное взаимодействие сравнимо со связью молекула-окружение, а также квантово-информационные аспекты, такие как запутанность. Все еще остается открытым вопрос, являются ли квантовая когерентность и молекулярные экситоны, созданные делокализацией возбужденных электронных состояний, существенными чертами механизма, обеспечивающего эффективный захват света и передачу энергии возбуждения на реакционный центр в фотосистемах [44, 82–88].

Различие в спектрально-статистических свойствах естественного света от теплового источника — Солнца и фемтосекундного лазерного импульса подразумевает переоценку последствий когерентных импульсных лазерных экспериментов, которые отображают эволюцию когерентности во времени в фотосинтетических компонентах, или в зрении — изомеризация родопсина. Фемтосекундные лазерные эксперименты показывают зависящую от времени когерентность и ее распад с течением времени, что дает важную информацию о природе связи хромофора с окружающей средой. Эта информация имеет решающее значение для определения гамильтониана таких систем, что необходимо для моделирования и понимания результата любого возбуждения. Однако когерентность, наблюдаемая в этих экспериментах, индуцированная лазерными импульсами, может и не наблюдаться в природе. Тем не менее альтернативные когерентности, относящиеся к связи системы и окружающей среды, могут выявить интересные квантовые эффекты [86].

Литература

- Silbey R. J. Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy By Shaul Mukamel (University of Rochester). —New York: Oxford University Press, 1995. — xviii + 543 pp. — DOI: 10.1021/ja965513d.
- 2. Blombergen1966ru.pdf, (n.d.).
- Hamm P. Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy: A Practical Approach or Mukamel for Dummies. — 2005.
- 4. Levenson M. The principles of nonlinear optics. 2004. —DOI: 10.1109/jqe.1985.1072657.
- 5. Kobayashi T. Development of Ultrashort Pulse Lasers for Ultrafast Spectroscopy // PHOTONICS. 2018. Vol. 5. DOI: 10.3390/photonics5030019.
- Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Mamedov M. D., Petrova A. A., Aybush A. V., Shuvalov V. A., Semenov A. Y., Nadtochenko V. A. Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Qy band // Biochim. Biophys. Acta. — Bioenergetics. — 2017. — Vol. 1858. — P. 895–905. — DOI: 10.1016/j.bbabio.2017.08.008.
- Gaizauskas E., Valkunas L. Femtosecond four-wave mixing spectroscopy of molecular aggregates // J. Phys. Chem. B. — 1997. — Vol. 101. — P. 7321–7326. —DOI: 10.1021/jp9639713.
- Smith E. R., Farrow D. A., Jonas D. M. Response functions for dimers and squaresymmetric molecules in four-wave-mixing experiments with polarized light // J. Chem. Phys. — 2005. — Vol. 123. — DOI: 10.1063/1.1953531.
- Zhang S., Li W., Li K., Li Y. Triphoton correlations in six-wave mixing // Ann. Phys. (N. Y.). — 2020. — Vol. 412. — P. 168000. — DOI: 10.1016/j.aop.2019.168000.
- Ding T., Ott C., Kaldun A., Blaetermann A., Meyer K., Stooss V., Rebholz M., Birk P., Hartmann M., Brown A., Van Der Hart H., Pfeifer T. Time-resolved four-wave-mixing spectroscopy for inner-valence transitions // Opt. Lett. — 2016. — Vol. 41. — P. 709– 712. — DOI: 10.1364/ol.41.000709.

- Miller R. J. D., Paarmann A., Prokhorenko V. I. Diffractive Optics Based Four-Wave, Six-Wave, ..., v-Wave Nonlinear Spectroscopy // Acc. Chem. Res. — 2009. — Vol. 42. — P. 1442–1451. — DOI: 10.1021/ar900040f.
- Weigand R., Crespo H. M. Fundamentals of Highly Non-Degenerate Cascaded Four-Wave Mixing // Appl. Sci. — 2015. — Vol. 5. — P. 485–515. — DOI: 10.3390/app5030485.
- Zhang Y., Khadka U., Anderson B., Xiao M., Zhang Y., Khadka U., Anderson B., Xiao M. Controlling four-wave and six-wave mixing processes in multilevel atomic systems // Appl. Phys. Lett. — 2007. — Vol. 91. — P. 221108. — DOI: 10.1063/1.2817744.
- Zhu W., Wang R., Zhang C., Wang G., Liu Y., Zhao W., Dai X., Wang X., Cerullo G., Cundiff S., Xiao M. Broadband two-dimensional electronic spectroscopy in an actively phase stabilized pump-probe configuration // Opt. Express. — 2017. — Vol. 25. — P. 21115–21126. — DOI: 10.1364/oe.25.021115.
- 15. Dobryakov A. L., Kovalenko S. A., Weigel A., Pérez-Lustres J. L., Lange J., Müller A., Ernsting N. P. Femtosecond pump/supercontinuum-probe spectroscopy: Optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing // Rev. Sci. Instrum. — 2010. — Vol. 81. — DOI: 10.1063/1.3492897.
- Palacino-Gonzalez E., Gelin M. F., Domcke W. Theoretical aspects of femtosecond double-pump single-molecule spectroscopy. I. Weak-field regime // Phys. Chem. Phys. — 2017. — Vol. 19. — P. 32296–32306. — DOI: 10.1039/c7cp04809b.
- Pollard W. T., Lee S. Y., Mathies R. A. Wave packet theory of dynamic absorption spectra in femtosecond pump-probe experiments // J. Chem. Phys. — 1990. — Vol. 92. — P. 4012–4029. — DOI: 10.1063/1.457815.
- Kumericki K. Feynman Diagrams for Beginners. 2016. P. 11–21. http://arxiv.org/abs/1602.04182.
- Kovalenko S. A., Dobryakov A. L., Ruthmann J., Ernsting N. P. Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing // Phys. Rev. A. — At. Mol. Opt. Phys. — 1999. — Vol. 59. — P. 2369–2384. —DOI: 10.1103/PhysRevA.59.2369.
- Michelini F., Beltako K., Cherepanov D., Nadtochenko V. Gate-controlled timedependent photocurrent in a biologically inspired optoelectronics // B. Witzigmann, M. Osinski, Y. Arakawa (eds.). — Phys. Simul. Optoelectron. DEVICES XXVIII, 2020. — DOI: 10.1117/12.2544188.
- Cherepanov D. A., Brady N. G., Shelaev I. V., Nguyen J., Gostev F. E., Mamedov M. D., Nadtochenko V. A., Bruce B. D. PSI-SMALP, a Detergent-free Cyanobacterial Photosystem I, Reveals Faster Femtosecond Photochemistry // Biophys. J. — 2020. — Vol. 118. — P. 337–351. — DOI: 10.1016/j.bpj.2019.11.3391.
- 22. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Aybush A. V., Mamedov M. D., Shuvalov V. A., Semenov A. Y., Nadtochenko V. A. Generation of ion-radical chlorophyll states in the light-harvesting antenna and the reaction center of cyanobacterial photosystem I // Photosynth. Res. — 2020. — Vol. 146. — P. 55–73. — DOI: 10.1007/s11120-020-00731-0.

- 23. Cherepanov D. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Mamedov M. D., Petrova A. A., Aybush A. V., Shuvalov V. A., Semenov A. Y., Nadtochenko V. A. Excitation of photosystem I by 760 nm femtosecond laser pulses: transient absorption spectra and intermediates // J. Phys. B – Atomic Mol. Opt. Phys. — 2017. — Vol. 50. — DOI: 10.1088/1361-6455/aa824b.
- Milanovsky G. E., Ptushenko V. V., Cherepanov D. A., Semenov A. Y. Mechanism of primary and secondary ion-radical pair formation in photosystem I complexes // Biochemistry (Moscow). — 2014. — Vol. 79. — P. 221–226. — DOI: 10.1134/ S0006297914030079.
- 25. Nadtochenko V., Denisov N., Aybush A., Gostev F., Shelaev I., Titov A., Umanskiy S., Cherepanov D. Ultrafast spectroscopy of fano-like resonance between optical phonon and excitons in CdSe quantum dots: Dependence of coherent vibrational wave-packet dynamics on pump fluence // Nanomaterials. — 2017. — Vol. 7. — P. 371. — DOI: 10.3390/nano7110371.
- 26. Meneghin E., Volpato A., Cupellini L., Bolzonello L., Jurinovich S., Mascoli V., Carbonera D., Mennucci B., Collini E. Coherence in carotenoid-to-chlorophyll energy transfer // Nat. Commun. — 2018. — Vol. 9. — P. 1–9. — DOI: 10.1038/s41467-018-05596-5.
- Sarovar M., Ishizaki A., Fleming G. R., Whaley K. B. Quantum entanglement in photosynthetic light-harvesting complexes // Nat. Phys. — 2010. — Vol. 6. — P. 2–7. — DOI: 10.1038/nphys1652.
- Mozgovaya M. N., Smitienko O. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Feldman T. B., Nadtochenko V. A., Sarkisov O. M., Ostrovsky M. A. Photochromism of visual pigment rhodopsin on the femtosecond time scale: Coherent control of retinal chromophore isomerization // Dokl. Biochem. Biophys. — 2010. — Vol. 435. — DOI: 10.1134/S1607672910060062.
- Smitienko O., Nadtochenko V., Feldman T., Balatskaya M., Shelaev I., Gostev F., Sarkisov O., Ostrovsky M. Coherent control of ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin. — 2015.
- Shigaev A. S., Feldman T. B., Nadtochenko V. A., Ostrovsky M. A., Lakhno V. D. New insight into the dynamics of rhodopsin photoisomerization from one-dimensional quantum-classical modeling // ArXiv. — 2017.
- 31. Smitienko O. A., Mozgovaya M. N., Shelaev I. V., Gostev F. E., Feldman T. B., Nadtochenko V. A., Sarkisov O. M., Ostrovsky M. A. Femtosecond formation dynamics of primary photoproducts of visual pigment rhodopsin // Biochem. — 2010. — Vol. 75. — DOI: 10.1134/S0006297910010049.
- 32. Ostrovsky M. A., Nadtochenko V. A. Femtochemistry of Rhodopsins // Russ. J. Phys. Chem. B. — 2021. — Vol. 15. — P. 344–351. — DOI: 10.1134/ S1990793121020226.
- Smitienko O., Nadtochenko V., Feldman T., Balatskaya M., Shelaev I., Gostev F., Sarkisov O., Ostrovsky M. Femtosecond laser spectroscopy of the rhodopsin photochromic reaction: A concept for ultrafast optical molecular switch creation

(ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin) // Molecules. — 2014. — Vol. 19. — DOI: 10.3390/molecules191118351.

- 34. Nadtochenko V. A., Smitienko O. A., Feldman T. B., Mozgovaya M. N., Shelaev I. V., Gostev F. E., Sarkisov O. M., Ostrovsky M. A. Conical intersection participation in femtosecond dynamics of visual pigment rhodopsin chromophore cis-trans photoisomerization // Dokl. Biochem. Biophys. — 2012. — Vol. 446. — DOI: 10.1134/S1607672912050080.
- 35. Shelaev I. V., Mozgovaya M. N., Smitienko O. A., Gostev F. E., Fel'dman T. B., Nadtochenko V. A., Sarkisov O. M., Ostrovskii M. A. Femtosecond dynamics of primary processes in visual pigment rhodopsin // Russ. J. Phys. Chem. B. — 2014. — Vol. 8. — DOI: 10.1134/S1990793114040101.
- 36. Smitienko O. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Fel'dman T. B., Nadtochenko V. A., Sarkisov O. M., Ostrovsky M. A. Coherent processes in formation of primary products of rhodopsin photolysis // Dokl. Biochem. Biophys. — 2008. — Vol. 421. — DOI: 10.1134/S160767290804008X.
- 37. Feldman T. B., Smitienko O. A., Shelaev I. V., Gostev F. E., Nekrasova O. V., Dolgikh D. A., Nadtochenko V. A., Kirpichnikov M. P., Ostrovsky M. A. Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin // J. Photochem. Photobiol. B Biol. — 2016. — Vol. 164. — DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.041.
- Paleček D., Edlund P., Westenhoff S., Zigmantas D. Quantum coherence as a witness of vibronically hot energy transfer in bacterial reaction center // Sci. Adv. — 2017. — Vol. 3. — DOI: 10.1126/sciadv.1603141.
- 39. Koyu S., Dodin A., Brumer P., Tscherbul T. V., Harush E. Z., Dubi Y. Light-induced processes in nature: Coherences in the establishment of the nonequilibrium steady state in model retinal isomerization // J. Chem. Phys. 2019. Vol. 013295. P. 12–18. DOI: 10.1063/1.5092981.
- 40. Shelaev I. V., Gostev F. E., Vishnev M. I., Shkuropatov A. Y., Ptushenko V. V., Mamedov M. D., Sarkisov O. M., Nadtochenko V. A., Semenov A. Y., Shuvalov V. A. P-680 (PD1PD2) and Chl(D1) as alternative electron donors in photosystem II core complexes and isolated reaction centers // J. Photochem. Photobiol. B Biology. — 2011. — Vol. 104. — P. 44–50. — DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.003.
- Scholes G. D. Coherence from Light Harvesting to Chemistry // J. Phys. Chem. Lett. 2018. — Vol. 9. — P. 1568–1572. — DOI: 10.1021/acs.jpclett.8b00734.
- Roscioli J. D., Ghosh S., LaFountain A. M., Frank H. A., Beck W. F. Quantum Coherent Excitation Energy Transfer by Carotenoids in Photosynthetic Light Harvesting // J. Phys. Chem. Lett. — 2017. — Vol. 8. — P. 5141–5147. — DOI: 10.1021/ acs.jpclett.7b01791.
- Bengtson C., Sjöqvist E. The role of quantum coherence in dimer and trimer excitation energy transfer // ArXiv. — 2017.
- 44. Cui X., Yan Y., Wei J. Theoretical Study on the Effect of Environment on Excitation Energy Transfer in Photosynthetic Light-Harvesting Systems // J. Phys. Chem. B. — 2020. — Vol. 124. — P. 2354–2362. — DOI: 10.1021/acs.jpcb.0c00266.

- 45. Pollard W. T., Mathies R. A. Analysis of femtosecond dynamic absorption spectra of nonstationary states // Annu. Rev. Phys. Chem. — 1992. — Vol. 43. — P. 497–523. — DOI: 10.1146/annurev.pc.43.100192.002433.
- 46. Fang C., Tang L. Mapping Structural Dynamics of Proteins with Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. 2020. P. 239–267.
- Kukura P., McCamant D. W., Mathies R. A. Femtosecond stimulated Raman spectroscopy // Annu. Rev. Phys. Chem. — 2007. — Vol. 58. — P. 461–488. — DOI: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104456.
- Soffer Y., Raanan D., Oron D. Low Frequency Collinear Pre-Resonant Impulsive Stimulated Raman Microspectroscopy // ACS Photonics. — 2020. — Vol. 7. — P. 3481– 3488. — DOI: 10.1021/acsphotonics.0c01504.
- Kim W., Kim T., Kang S., Hong Y., Würthner F., Kim D. Tracking Structural Evolution during Symmetry Breaking Charge Separation in Quadrupolar Perylene Bisimide with Time Resolved Impulsive Stimulated Raman Spectroscopy // Angew. Chemie. — 2020. — Vol. 132. — P. 8649–8656. — DOI: 10.1002/ange.202002733.
- 50. Prince R. C., Frontiera R. R., Potma E. O. Stimulated Raman scattering: From bulk to nano // Chem. Rev. 2017. Vol. 117. P. 5070–5094. DOI: 10.1021/ acs.chemrev.6b00545.
- 51. Kostrov A. N., Aybushev A. V., Gostev F. E., Shelayev I. V., Sarkisov O. M., Denisov N. N., Khudyakov D. V., Nadtochenko V. A. Femtosecond pulse excitation of vibrational wave packets in chloroform: The effect of gold nanoparticles // High Energy Chem. — 2011. — Vol. 45. — DOI: 10.1134/S0018143911030088.
- 52. Kuramochi H., Takeuchi S., Tahara T. Femtosecond time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy using sub-7-fs pulses: Apparatus and applications // Rev. Sci. Instrum. — 2016. — Vol. 87. — DOI: 10.1063/1.4945259.
- McCamant D. W. Femtosecond stimulated raman spectroscopy // Encycl. Spectrosc. Spectrom. — 2016. — Vol. 121. — P. 597–602. — DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12153-5.
- 54. Batignani G., Ferrante C., Fumero G., Scopigno T. Broadband Impulsive Stimulated Raman Scattering Based on a Chirped Detection // J. Phys. Chem. Lett. 2019. Vol. 10. P. 7789–7796. DOI: 10.1021/acs.jpclett.9b03061.
- 55. Sun Z., Lu J., Zhang D. H., Lee S. Y. Quantum theory of (femtosecond) time-resolved stimulated Raman scattering // J. Chem. Phys. — 2008. — Vol. 128. — DOI: 10.1063/ 1.2888551.
- 56. Kuramochi H., Takeuchi S., Tahara T. Ultrafast photodissociation dynamics of diphenylcyclopropenone studied by time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy // Chem. Phys. — 2018. — Vol. 512. — P. 88–92. — DOI: 10.1016/ j.chemphys.2018.02.023.
- 57. Zhao B., Niu K., Li X., Lee S. Y. Simple aspects of femtosecond stimulated Raman spectroscopy // Sci. China Chem. — 2011. — Vol. 54. — P. 1989–2008. — DOI: 10.1007/s11426-011-4430-8.

- 58. Kang D.-g., Woo K. C., Kang D. H., Park C., Kim S. K. Improved spectral resolution of the femtosecond stimulated Raman spectroscopy achieved by the use of the 2nd-order diffraction method // Sci. Rep. — 2021. — Vol. 11. — P. 1–7. —DOI: 10.1038/s41598-021-83090-7.
- Falconieri M., Gagliardi S., Rondino F., Marrocco M., Kulatilaka W. D. High-sensitivity impulsive stimulated Raman spectrometer with fast data acquisition // J. RAMAN Spectrosc. — 2021. — Vol. 52. — P. 664–669. — DOI: 10.1002/jrs.6048.
- Ashner M. N., Tisdale W. A. High repetition-rate femtosecond stimulated raman spectroscopy with fast acquisition // ArXiv. — 2018. — Vol. 26. — P. 18331–18340. — DOI: 10.1364/oe.26.018331.
- 61. Glerean F., Marcantoni S., Sparapassi G., Blason A., Esposito M., Benatti F., Fausti D. Quantum model for impulsive stimulated raman scattering // ArXiv. 2018.
- Rafiq S., Scholes G. D. From Fundamental Theories to Quantum Coherences in Electron Transfer // J. Am. Chem. Soc. — 2019. — Vol. 141. — P. 708–722. — DOI: 10.1021/jacs.8b09059.
- Kumar S., Kamali T., Levitte J. M., Katz O., Hermann B., Werkmeister R., Povazay B., Drexler W., Unterhuber A., Silberberg Y. Single-pulse CARS based multimodal nonlinear optical microscope for bioimaging // Opt. Express. — 2015. — Vol. 23. — P. 13082–13098. — DOI: 10.1364/oe.23.013082.
- Polack T., Oron D., Silberberg Y. Control and measurement of a non-resonant Raman wavepacket using a single ultrashort pulse // Chem. Phys. — 2005. — Vol. 318. — P. 163–169. — DOI: 10.1016/j.chemphys.2005.06.018.
- Namboodiri V., Scaria A., Namboodiri M., Materny A. Investigation of molecular dynamics in beta-carotene using femtosecond pump-FWM spectroscopy // LASER Phys. — 2009. — Vol. 19. — P. 154–161. — DOI: 10.1134/S1054660X09020029.
- 66. Premadasa U. I., Bible A. N., Morrell-Falvey J. L., Doughty B., Ma Y.-Z. Spatially coregistered wide-field nonlinear optical imaging of living and complex biosystems in a total internal reflection geometry // Analyst. (n.d.). — DOI: 10.1039/ d1an00129a.
- Leng X., Yue S., Weng Y. X., Song K., Shi Q. Effects of finite laser pulse width on twodimensional electronic spectroscopy // Chem. Phys. Lett. — 2017. — Vol. 667. — P. 79– 86. — DOI: 10.1016/j.cplett.2016.11.030.
- Gelzinis A., Butkus V., Songaila E., Augulis R., Gall A., Büchel C., Robert B., Abramavicius D., Zigmantas D., Valkunas L. Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenerg. – 2015. – Vol. 1847. – P. 241–247. – DOI: 10.1016/j.bbabio.2014.11.004.
- Cheng Y.-C., Fleming G. R. Coherence Quantum Beats in Two-Dimensional Electronic Spectroscopy // J. Phys. Chem. A. — 2008. — Vol. 112. — P. 4254–4260. —DOI: 10.1021/JP7107889.
- 70. Balevičius V., Gelzinis A., Abramavicius D., Mančal T., Valkunas L. Excitation dynamics and relaxation in a molecular heterodimer // Chem. Phys. — 2012. — Vol. 404. — P. 94–102. — DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.02.021.

- Gelzinis A., Augulis R., Butkus V., Robert B., Valkunas L. Two-dimensional spectroscopy for non-specialists // Biochim. Biophys. Acta. – Bioenerg. — 2019. — Vol.1860. — P. 271–285. — DOI: 10.1016/j.bbabio.2018.12.006.
- 72. Jonas D. M. Two-Dimensional Femtosecond Spectroscopy // Annual Review of Physical Chemistry. — 2003. — Vol. 54. — P. 425–463. — DOI: 10.1146/ annurev.physchem.54.011002.103907.
- 73. Jonas D. M. Vibrational and Nonadiabatic Coherence in 2D Electronic Spectroscopy, the Jahn–Teller Effect, and Energy Transfer // Annual Review of Physical Chemistry. — 2016. — Vol. 69. — P. 327–352. — DOI: 10.1146/annurev-physchem-052516-050602.
- 74. Tiwari V., Peters W. K., Jonas D. M. Vibronic coherence unveiled // Nat. Chem. 2014. Vol. 6. P. 173–175. DOI: 10.1038/nchem.1881.
- 75. Cheng Y.-C., Fleming G. R. Dynamics of Light Harvesting in Photosynthesis // Annual Review of Physical Chemistry. — 2009. — Vol. 60. — P. 241–262. — DOI: 10.1146/ annurev.physchem.040808.090259.
- 76. Brixner T., Stenger J., Vaswani H. M., Cho M., Blankenship R. E., Fleming G. R. Twodimensional spectroscopy of electronic couplings in photosynthesis // Nat. — 2005. — Vol. 434. — P. 625–628. — DOI: 10.1038/nature03429.
- 77. Read E. L., Engel G. S., Calhoun T. R., Mančal T., Ahn T. K., Blankenship R. E., Fleming G. R. Cross-peak-specific two-dimensional electronic spectroscopy // Proc. Natl. Acad. Sci. 2007. Vol. 104. P. 14203–14208. DOI: 10.1073/PNAS.0701201104.
- Fuller F. D., Ogilvie J. P. Experimental Implementations of Two-Dimensional Fourier Transform Electronic Spectroscopy // Annual Review of Physical Chemistry. — 2015. — Vol. 66. — P. 667–690. — DOI: 10.1146/annurev-physchem-040513-103623.
- 79. Myers J. A., Ogilvie J. P., Lewis K. L. M., Tekavec P. F. Two-color two-dimensional Fourier transform electronic spectroscopy with a pulse-shaper // Opt. Express. — 2008. — Vol. 16, Issue 22 — P. 17420–17428. — DOI: 10.1364/OE.16.017420.
- 80. Engel G. S., Calhoun T. R., Read E. L., Ahn T. K., Mančal T., Cheng Y. C., Blankenship R. E., Fleming G. R. Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems // Nature. — 2007. — Vol. 446. — P. 782–786. — DOI: 10.1038/NATURE05678.
- Brixner T., Stenger J., Vaswani H. M., Cho M., Blankenship R. E., Fleming G. R. Twodimensional spectroscopy of electronic couplings in photosynthesis // Nature. — 2005. — Vol. 434. — P. 625–628. — DOI: 10.1038/NATURE03429.
- Popp W., Brey D., Binder R., Burghardt I. Quantum Dynamics of Exciton Transport and Dissociation in Multichromophoric Systems // Annu. Rev. Phys. Chem. — 2021. — Vol. 72. — DOI: 10.1146/annurev-physchem-090419-040306.
- Arpin P. C., Turner D. B. Signatures of Vibrational and Electronic Quantum Beats in Femtosecond Coherence Spectra // J. Phys. Chem. A. — 2021. — Vol. 125, No. 12. — P. 2425–2435. — DOI: 10.1021/acs.jpca.0c10807.
- Harush E. Z., Dubi Y. Do photosynthetic complexes use quantum coherence to increase their efficiency? Probably not // Science advances. — 2021. — Vol. 7, Issue 8. — P. 1–9.

- 85. Dods R., Bath P., Morozov D., Gagner V. A., Arnlund D., Luk H. L., Kubel J., Maj M., Vallejos A., Wickstrand C., Bosman R., Beyerlein K. R., Nelson G., Liang M., Milathianaki D., Robinson J., Harimoorthy R., Berntsen P., Malmerberg E., Johansson L., Andersson R., Carbajo S., Claesson E., Conrad C. E., Dahl P., Hammarin G., Hunter M. S., Li C., Lisova S., Royant A., Safari C., Sharma A., Williams G. J., Yefanov O., Westenhoff S., Davidsson J., DePonte D. P., Boutet S., Barty A., Katona G., Groenhof G., Branden G., Neutze R. Ultrafast structural changes within a photosynthetic reaction centre // Nature. 2021. Vol. 589. P. 310–314. DOI: 10.1038/s41586-020-3000-7.
- 86. Tomasi S., Kassal I. Classification of Coherent Enhancements of Light-Harvesting Processes // J. Phys. Chem. Lett. — 2020. — Vol. 11. — P. 2348–2355. — DOI: 10.1021/acs.jpclett.9b03490.
- 87. Cao J., Cogdell R. J., Coker D. F., Duan H. G., Hauer J., Kleinekathöfer U., Jansen T. L. C., Mančal T., Dwayne Miller R. J., Ogilvie J. P., Prokhorenko V. I., Renger T., Tan H. S., Tempelaar R., Thorwart M., Thyrhaug E., Westenhoff S., Zigmantas D. Quantum biology revisited // Sci. Adv. — 2020. — Vol. 6. — DOI: 10.1126/SCIADV.AAZ4888.
- Olšina J., Dijkstra A. G., Wang C., Cao J. Can Natural Sunlight Induce Coherent Exciton Dynamics? // 2014. — http://arxiv.org/abs/1408.5385 (accessed October 18, 2021).

Methods of femtosecond laser spectroscopy in the study of photobiological processes

V. A. Nadtochenko^{1,2}, A. V. Aybush¹

¹Semenov Institute of Chemical Physics ²Lomonosov Moscow State University, Faculty of chemistry

The development of optical technologies for obtaining ultrashort laser pulses has led to the emergence of advanced approaches to studying the fundamental properties of objects with complex chemical composition. In this regard, femtosecond laser pulses provide the richest opportunities for creating new experimental techniques that use the amplitude, temporal, and spectral features of this type of laser radiation. The ultrashort duration of femtosecond pulses makes it possible to study primary time-resolved processes in matter up to femtosecond and subpicosecond time scales. The low energy of such pulses makes it possible to significantly reduce the various effects of thermal heating, and the high peak intensity opens up possibilities for the effective detection of a nonlinear response in a substance. The spectral width of femtosecond pulses, which can be thousands of reciprocal centimeters, allows broadband detection of the electronic and vibrational bands of the systems under study. In particular, the phasing of the spectral components of femtosecond pulses, as well as the possibility of creating pulses with certain phase characteristics, makes it possible to study coherent effects at ultrashort times, which provides new knowledge about the organization of complex molecular systems. Approaches that use several femtosecond pulses with a precise time delay up to a few attoseconds, a non-collinear configuration of the interaction of pulses in matter, make it possible to single out the process under study in terms of direction, as well as achieve simultaneously high temporal and spectral resolution, which opens up the possibility of studying systems with complex and overlapping spectral characteristics. This paper describes the main methods of femtosecond laser spectroscopy in the study of biological systems.

Keywords: femtosecond laser spectroscopy, nonlinear optics, pump-probe, quantum beat spectroscopy, quantum coherence, wave packet, impulse stimulated Raman spectroscopy, activation pulse, two-pulse photon echo, two-dimensional femtosecond spectroscopy.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА — ГОРИЗОНТЫ РАЗВИТИЯ

С. И. Барцев^{1, 2}, А. Г. Дегерменджи¹, А. Б. Сарангова², Н. Н. Дегерменджи³

Экологическая биофизика преимущественно использует идеализированные описания, на основе которых строятся максимально простые, концептуальные модели. Но сами объекты исследования — экосистемы и биосфера в целом обладают рядом свойств, которые резко усложняют их исследование. Принципиальная уникальность каждой экосистемы обуславливает невозможность проведения с ними «острых» экспериментов. Сами компоненты экосистем и связи между ними также являются нелинейными, что порождает сложную динамику. Динамика экосистемы принципиально зависит от небиологических условий внешней среды, т. е. погоды и климата, которые сами проявляют сложную динамику и, в то же время, демонстрируют зависимость от глобального и локального состояния биосферы. Для получения общезначимых экологических результатов обязательно прописывать условия подобия, формализующие сходство между уникальными экосистемами. Разработка технологии подобизации экологических систем позволила бы дополнить арсенал экологии настоящим экспериментом, осуществляемым на искусственных экосистемах. Поскольку взаимодействие между всеми организмами в принципе возможно только на основе единой биохимической базы, то простраивание сквозных связей между биохимией и физиологией организмов и их экологической ролью, выражаемое, в частности, и через стехиометрические ограничения представляется необходимым для максимально адекватного описания экосистем. Обсуждается специфика моделирования замкнутых экосистем и биосферы и парадокс Вернадского-Дарвина. На примерах показана необходимость перехода к моделям, основанным на гипотезе об изменчивости стехиометрических коэффициентов, которые могут быть названы моделями с гибким или адаптивным метаболизмом. Обсуждается проблема глобального потепления климата.

Ключевые слова: экологическая биофизика, математическое моделирование, биосфера, экспериментальные экологические системы, воспроизводимость экологических экспериментов, экологическое подобие, модели гибкого метаболизма, парадокс Вернадского–Дарвина, принцип наихудшего сценария, модель климатических сдвигов.

> Все должно быть сделано так просто, насколько возможно, но ничуть не проще. *А. Эйнштейн*

¹ Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

² Сибирский федеральный университет.

³ Красноярский государственный медицинский университет. E-mail: nn1947@yandex.ru

Введение. Методы и подходы биофизики и экологической биофизики

Само название одного из разделов биофизики — «экологическая биофизика» со всей определенностью указывает на то, что объектом исследования этого направления являются экологические системы и глобальная экосистема — биосфера Земли. С большой вероятностью у читателя может возникнуть вопрос, какое отношение может иметь физика к этому направлению исследований, если вид экологических законов и математических моделей не зависит даже от конкретной природы организмов, их биохимической основы, которая может влиять только на значения параметров этих уравнений. Что же говорить о физических законах, которые описывают базовый, самый нижний уровень иерархии, далеко отстоящий от вершины иерархической лестницы организации живого.

Уместность термина «экологическая биофизика» зависит от того, что понимается под термином «биофизика». Здесь же имеется аналогичный разрыв если специфика дисциплин, возникших при взаимодействии смежных, по иерархии, наук — «физическая химия», «биохимия», особых вопросов не вызывает, то в случае биофизики мы имеем тот же логический разрыв, как и в случае с экологической биофизикой — физика «перескакивает» через один уровень иерархии — химию.

Логический разрыв исчезает, если принять, что вклад физики в биофизику и тем более в экологическую биофизику осуществляется не через прямое применение физических теорий и моделей, а через использование методологии физики. Об этом, например, говорил М. В. Волькенштейн: «Задачи биофизики состоят в познании явлений жизни, основанном на **общих принципах физики**, и изучении атомно-молекулярной структуры вещества» [Волькенштейн, 1978, с. 8]. Как представляется, ключевым в этом определении является замечание методологического характера о том, что познание явлений должно основываться на общих принципах физики.

В том же направлении ориентировано парадоксальное по форме определение, предложенное Л. А. Блюменфельдом: «Биофизика — это область биологии, в которой должны предпочтительно работать ученые, имеющие фундаментальное физическое образование» [Блюменфельд, 2002, с. 5]. Постараемся понять, что Блюменфельд имел в виду. Похоже, он считал, что фундаментальное физическое образование имеет свои особенности, и способ мышления человека, получившего это образование, отличается от способа мышления других специалистов. Это различие в мышлении должно проявляться при работе с одним и тем же объектом. И биология и биофизика работают с одними и теми же объектами, но по-разному. В чем же различие?

По мнению известного биолога Дж. Бернала, «биология — это в основном описательная наука, больше похожая на географию. ...Несомненно, должна су-

ществовать также подлинная и общая биология. Истинная биология в полном смысле этого слова была бы наукой о природе и активности всех организованных объектов, где бы они ни находились — на нашей планете, на других планетах солнечной системы или в иных звездных системах» [Бернал, 1968, с. 110]. Согласно Берналу современной биологии лучше подошло бы название биография, но этот термин уже занят. Биология описывает «имеющиеся у нее перед глазами» живые объекты, при этом ей не чуждо и эмпирическое обобщение в пределах исследованного материала.

Суть физического подхода к биологическим системам исчерпывающе выразил известный биофизик Н. Рашевский: «Мы начинаем с исследования в высшей степени **идеализированных систем**, которые могут не иметь никаких прямых аналогов в реальной природе. Против такого подхода можно выдвинуть возражение, что подобные системы не имеют никакой связи с действительностью и что поэтому никакие заключения относительно таких систем не могут быть перенесены на реальные системы. Тем не менее именно этот подход применяли и всегда применяют в физике...».

«...Физик занимается детальным математическим исследованием таких нереальных вещей, как "материальные точки", "абсолютно твердые тела", "идеальные жидкости" и т. п. *В природе подобных вещей не существует*...».

«...Однако же физик не только изучает их, но и применяет свои выводы к *реальным вещам*. Все дело в том, что в известных пределах реальные вещи имеют свойства, общие с воображаемыми идеальными объектами! Только сверхчеловек мог бы охватить в математическом аспекте сразу всю сложность реального предмета. Мы, обыкновенные смертные, должны быть скромнее, и нам следует подходить к реальности асимптотически, путем постепенного приближения» (цитируется с небольшими сокращениями по [Моровиц, 1968, с. 41]).

Здесь Рашевский практически описал особенности мышления человека с фундаментальным физическим образованием, способ его работы с объектами живой природы. Биофизик, в отличие от биолога, не занимается поиском обобщений и закономерностей, свойственных широкому классу изучаемых объектов, вернее, он это тоже делает, но не это является главным в его подходе к живому. Биофизик отличается от биолога не применением физических теорий и физических приборов к исследованию живых систем, а тем, что он явно работает с идеализированными системами, конструктами. И в какой мере это удается — в той же мере можно говорить о биофизическом подходе. На основе вышесказанного можно сформулировать рабочее определение биофизики: «Биофизика — это наука, занимающаяся построением и исследованием идеализированных систем, моделирующих живое на различных уровнях его организации».

Если следовать этому пониманию биофизики, то биофизические модели исходно должны быть предельно простыми, описывающими основные, сущно-

стные свойства исследуемой системы. Такого рода модели называются концептуальными. Естественно, эти модели могут при необходимости усложняться, обеспечивая растущую адекватность описания реальных систем, при этом вклад каждого приближения может быть конкретно оценен.

Предложенному пониманию биофизики и особенности ее подхода хорошо соответствует «**эвристический метод**», предложенный фон Нейманом [Фон Нейман, 1971, с. 98]. В том случае, когда из-за сложности изучаемого биологического объекта не удается сконструировать идеализированную систему, предельно простым способом описывающую ключевое свойство исследуемого объекта, исследователи обращаются к математическим моделям особого вида, которые можно, следуя названию метода, назвать **эвристическими**. Эти модели не имеют прямых прототипов среди существующих в природе систем. В теоретической биофизике эти модели используются для работы с проблемами, имеющими **принципиальный** характер.

Примеры построения эвристических моделей хорошо известны, перечислим только некоторые из них. **Принципиальная возможность** возникновения организованности в гомогенной среде была показана А. Тьюрингом [Turing, 1952] на абстрактной модели, не соответствующей никакой реальной химической системе. Модель гиперциклов М. Эйгена (1973) не была предназначена для объяснения реального процесса возникновения жизни на Земле — она продемонстрировала **принципиальную возможность** этого процесса и сформулировала общие условия его протекания.

Исследования свойств простых клеточных автоматов (Дж. фон Нейман, Дж. Конвэй, С. Вольфрам, С. А. Кауффман, Б. Мандельброт, П. Бак, К. Танг и К. Визенфельд) привели к отрытию самоорганизованной критичности **принципиального** механизма, с помощью которого возникновение сложности из простых локальных взаимодействий может быть спонтанным и, следовательно, лежать в основе естественной сложности живого.

Концептуальные и эвристические модели являются, таким образом, основными теоретическими инструментами биофизического исследования. Перейдем к специфике теоретического исследования экологических систем. В соответствии с общим подходом биофизики, модели экологической биофизики тоже должны быть достаточно простыми, описывающими ключевые механизмы динамики экосистем, т. е. иметь концептуальный характер. В этом принципиальное отличие подхода экологической биофизики от обычного математического моделирования экосистем, биосферы и объединенной системы «биосфера– климат», где используются большие распределенные математические модели.

Каждый уровень иерархии живого имеет свою специфику, есть своя специфика и у экосистем. Выделим ту их особенность, которая в наибольшей степени влияет на процесс их изучения. В отличие от молекулярной биофизики, где исследователи имеют дело с идентичными копиями ферментов, или клеточной биофизики, где у исследователей есть возможность работать с клеточными клонами, что обеспечивает воспроизводимость результатов экспериментов, каждый объект исследования экологической биофизики — экосистема — уникальна, т. е. единственна в своем роде.

Эта уникальность экологических систем в сочетании с их сложностью приводит к тому, что необходимое требование естественнонаучного исследования воспроизводимость результатов экспериментов и наблюдений — не может быть в полной мере выполнено. Тем самым уникальность экосистем порождает проблему обеспечения общенаучного базиса экологических исследований. Необходимо разработать приемы осознанной работы с уникальными системами, когда закономерности, выявленные на основе анализа результатов, полученных на одной уникальной системе, могут быть перенесены на другую уникальную систему.

Однако, несмотря на уникальность экосистем, их можно сравнивать по каким-либо выделенным свойствам, значимым для целей исследования, что, впрочем, и делается, правда, без должной акцентуации. Изучение уникальных систем предполагает отношение к ним как к моделям друг друга. Здесь очень уместным является следующее определение: «Если между двумя объектами можно установить соответствие хотя бы в каком-нибудь одном определенном смысле, то между этими объектами существует отношение оригинала и модели» [Лернер, 1967, с. 40].

Конечная задача биологического исследования заключается в выявлении механизма изучаемого процесса, что дает возможность прогнозировать поведение системы даже в тех условиях и при тех воздействиях, которые ранее не исследовались. Так, например, выявление адекватных механизмов тех или других процессов в биосфере является необходимым условием успешного прогноза ее будущей динамики.

Содержательно задача здесь заключается в отработке формальных процедур, которые для любого выбранного свойства или функции системы могли бы устанавливать взаимно-однозначное соответствие между структурами подобных систем, обладающих данным свойством или функцией.

В исследовательском арсенале экологической биофизики помимо моделирования и полевых наблюдений имеются замкнутые по потоку вещества экспериментальные экологические системы, которые с практической точки зрения являются прототипами систем жизнеобеспечения космических миссий, а с фундаментальной — выступают как простейшие модели земной биосферы. Эти модели в значительной мере соответствуют ориентации экологической биофизики на концептуальные модели, которые здесь имеют материальное воплощение. На экспериментальных микромоделях биосферы можно исследовать принципиальные вопросы осуществимости и устойчивости замкнутых экосистем.

Замкнутость по потоку вещества — это не экзотическое свойство экспериментальных замкнутых экологических систем, она является ключевым свойст-

вом земной биосферы [Вернадский, 2012]. Именно благодаря круговороту веществ, биосфера смогла просуществовать миллиарды лет. На примере круговорота углерода можно легко показать значимость этого свойства биосферы. Так, общее количество углерода в атмосфере примерно равно 750 Гт. Чистая первичная продукция фотосинтеза наземных растений оценивается в 60 ГтС в год. Простая грубая оценка показывает, что если бы фотосинтез не компенсировался противоположным потоком углекислого газа, то растения поглотили бы весь углерод из атмосферы за время, немного превышающее 10 лет. Более корректные оценки [Bartsev, Degermendzhi, Sarangova, 2019] показывают, что растения поглотили бы 99 % углекислого газа атмосферы за немногим большее время, чем 60 лет — ничто по геологическим масштабам времени. Наглядным подтверждением интенсивности процессов круговорота являются сезонные изменения атмосферной концентрации углекислого газа, вызванные существенным различием биомассы наземных растений в северном и южном полушариях. Отсюда следует, что точный баланс глобальных потоков углерода, т. е. замкнутость этих потоков, является необходимым условием существования биосферы и должны учитываться в моделях естественной и искусственных биосфер. В то же время высокий уровень замкнутости по лимитирующим химическим элементам (азот, фосфор) характерен и для большинства локальных экосистем.

На некоторые вопросы относительно будущего нашей биосферы вряд ли можно ответить, не прибегая к концептуальным математическим моделям. К вопросам предельной важности относится вопрос об устойчивости земной биосферы к нарастающему антропогенному воздействию. Сложность системы «биосфера–климат» (СБК), наличие множества разнообразных обратных связей и принципиальная нелинейность составляющих ее экологических и климатических компонентов и/или подсистем заставляют сделать допущение, что отклик СБК на равномерно возрастающее антропогенное воздействие может иметь пороговый и, в худшем случае, катастрофический характер. Предельно важно выделить самые опасные, т. е. заметные и одновременно быстрые, обратные связи, чтобы оценить различные способы предотвращения катастрофических необратимых изменений.

Уникальность экосистем и экологическое подобие

Как уже было отмечено во введении, нет одинаковых природных экосистем, каждая из них уникальна. Уникальность, присущая экологической системе, приводит к тому, что необходимое требование научных исследований — воспроизводимость эксперимента — не может быть полностью удовлетворено при изучении экологических систем. Получение экспериментальных данных и интерпретация результатов всегда проводятся в рамках конкретного модельного представления системы. Поэтому, строго говоря, общее решение проблемы воспроизводимости экологических экспериментов и перенос полученных результатов в другие экосистемы стало бы возможным после разработки формальных процедур для установления подобия между моделями уникальных систем [Degermendzhi, 2009]. Ситуация в экологии осложняется тем, что подобие в аэро- и гидродинамике строится на основе уравнения Навье–Стокса, что позволяет использовать почти стандартные формулы преобразования подобия. К сожалению, в экологии имеется моделей больше, чем имеется экосистем, поскольку стандарта описания экосистем нет и каждая экосистема может быть описана (с разной степенью успеха) множеством разных моделей.

Принципиальная выполнимость формальной процедуры подобизации была показана на примере очень абстрактной модели нейронной сети [Барцев, Барцева, 2002, 2005, 2010]. Введение понятий функциональной симметрии и функционально-инвариантных преобразований позволило показать, что структуры рассматриваемых нейронных сетей, выполняющие одну и ту же функцию, могут быть преобразованы друг в друга с помощью одного непрерывного и двух дискретных преобразований. В то время как дискретные преобразования тесно связаны со специфической организацией нейронных сетей, непрерывное преобразование, выполняемое бесконечно малым оператором группы Ли, может применяться к моделям систем, не относящихся к нейронным сетям.

Процедуру применения локальной симметрии к уравнениям, описывающим экологическую систему, можно описать следующим образом. Критерий инвариантности системы уравнений $\Phi_k(x) = 0$ относительно группы, задаваемой инфинитезимальным оператором, имеет следующий вид:

$$X\Phi_k(x)\Big|_M = 0, \quad k = 1, 2, ..., S (S < N),$$
 (1)

где M — это (N - S)-поверхность, задаваемая системой уравнений $\Phi_i(x) = 0$; $X = \lambda_i \frac{\partial}{\partial x_i}$ — инфинитезимальный оператор группы Ли непрерывных преобра-

зований (суммирование осуществляется по повторяющимся индексам); λ_i — компонента вектора переноса, лежащего в плоскости касательной к поверхности M; N — количество переменных; S — количество уравнений.

Рассмотрим процедуру поиска структур экосистем, сохраняющих заданное свойство как инвариант, подробнее. Пусть экосистема описывается системой уравнений общего вида:

$$\dot{X}_i = F_i(\vec{X}, \vec{a}),$$

где X_i — переменные системы; вектор *a* обозначает совокупность параметров системы уравнений.

Если возникает задача поиска общих связей типа структура-функция, структура-свойство у различных экосистем, то требование совпадения решений систем дифференциальных уравнений (конкретных траекторий переменных экосистемы) представляется излишне жестким. Остановимся на отслеживании свойств стационарного состояния системы. Тогда система уравнений, задающих связь между параметрами системы и ее стационарным состоянием, имеет вид:

$$F_i(\vec{X}^*, \vec{a}) = 0.$$
 (2)

Набор показателей, которые должны сохраняться неизменными при преобразованиях структуры системы (параметров $\{a_k\}$), задается следующей системой:

$$P_l(\vec{X}^*, \vec{a}) = \text{const}$$
 или $P_l(\vec{X}^*, \vec{a}) - \text{const} = 0,$ (3)

где *l* = 1, ..., *L*, и *L* — количество уравнений, описывающих набор показателей, которые должны сохраняться при преобразованиях структуры.

В качестве примера рассмотрим эту процедуру, выбрав в качестве инвариантных характеристик экологической модели набор собственных значений линеаризованной системы в окрестности стационарного состояния. Набор собственных значений является одним из показателей, используемых для оценки устойчивости экосистем [Свирежев, Логофет, 1978].

Локальное преобразование, сохраняющее собственные значения в общем случае можно получить, применяя инфинитезимальный оператор к уравнениям на стационарные концентрации и к элементарным симметрическим функциям [Хорн, 1989] соответствующей степени. Для систем второго порядка этими функциями являются след и детерминант матрицы линейного приближения исследуемой модели:

$$\operatorname{Sp} A = \sum_{i=1}^{n} \lambda_{i}, \quad \det A = \prod_{i=1}^{n} \lambda_{i}.$$
(4)

То есть для систем второго порядка неизменность одновременно и следа и детерминанта матрицы означает неизменность собственных значений.

Поскольку для сложных нелинейных систем аналитическое вычисление стационарных состояний и собственных значений невозможно, можно применить инфинитезимальное преобразование не только к параметрам модели, но и стационарным значениям, рассматривая их как параметры. Применение критерия инвариантности (1) к системе уравнений (2) и (3) порождает систему уравнений, задающих инвариантное многообразие:

$$\begin{cases} \sum_{j=1}^{N} \lambda_j \frac{\partial F_i}{\partial X_j^*} + \sum_{k=1}^{K} \lambda_k \frac{\partial F_i}{\partial a_k} = 0, \\ \sum_{j=1}^{N} \lambda_j \frac{\partial P_l}{\partial X_j^*} + \sum_{k=1}^{K} \lambda_k \frac{\partial P_l}{\partial a_k} = 0, \end{cases}$$
(5)

где λ_i — компоненты вектора (малого по величине) переноса, сохраняющего неизменным выделенное свойство; N — количество переменных модели, а значит и количество уравнений (2); K — количество модельных параметров, кото-
рым разрешили меняться. Частные производные берутся в текущей стационарной точке и текущих значениях параметров модели.

Линейная система (5) состоит из N + L уравнений и содержит N + K переменных. Типичной является ситуация когда K > L, а система состоит из линейно независимых уравнений. В этом случае система имеет бесконечное множество нетривиальных решений, образующих базис размерностью K - L. То есть весь набор компонент вектора перемещений можно определить, произвольно задавая K - L из них и вычисляя оставшиеся по формуле:

$$\lambda_m = f_m \left(\vec{X}^*, \vec{a}, \{ \lambda_r \} \right), \quad r = 1, \dots, K - L, \tag{6}$$

причем вид функций f_m можно определить всегда, в силу линейности системы (5).

Зная компоненты вектора малых приращений $\{\lambda_r\}$, можно организовать итерационный процесс, задавая желаемое направление изменения параметров. Тогда новые значения стационарной точки и параметров системы находятся по формулам:

$$\begin{cases} X_i^{**} = X_i^* + \lambda_i, \\ a_k^* = a_k + \lambda_k. \end{cases}$$
(7)

Эта итерационная процедура напоминает интегрирование систем обыкновенных дифференциальных уравнений, но применяемое по отношению к параметрам модели, а не к ее переменным. Процедура обеспечивает постепенное перемещение по инвариантному многообразию и формирование структур, сохраняющих выбранное свойство, в случае если такие структуры допустимы.

Продемонстрируем преобразование простой модели замкнутой экосистемы в более простую модель с сохранением собственных значений:

$$\begin{cases} \dot{X}_{1} = a \left(A_{0} - X_{1} - X_{2}\right) X_{1} - \frac{\mu X_{1} X_{2}}{K + X_{1}}, \\ \dot{X}_{2} = \frac{\mu X_{1} X_{2}}{K + X_{1}} - m X_{2}. \end{cases}$$
(8a)

Из якобиана этой системы (из-за громоздкости не приводится) формируем выражения для следа и детерминанта матрицы линейных приращений. Важно отметить, что мы не вычисляем аналитически стационарные значения, а рассматриваем их как параметры, т. е. эта процедура может приводить к громоздким выражениям, но технически всегда осуществима.

Далее нам нужно конкретизировать модель, т. е. подставить определенные значения параметров (допустим известные из наблюдений), а стационарные значения тоже подставляем из данных наблюдений (проверка согласованности модели) и/или рассчитываем их или некоторую их часть численно. Допустим, для исходной модели выбраны следующие значения параметров: $\overline{X}_1 = 0,5, \quad \overline{X}_2 = 0,1, \quad a = 0,5, \quad A_0 = 1, \quad \mu = 2, \quad K = 0,5, \quad m = 1.$

Собственные значения этой модели, вычисленные не для процедуры, а для контроля качества инвариантного преобразования равны: $\lambda_{1,2} = -0,0750 \pm 0.34551i$. После формирования системы вида (5) к данной модели и к формулам следа и детерминанта можем выбрать свободные параметры, которые мы хотим изменить. Допустим, мы хотим упростить модель и убрать трофическую функцию вида Моно из модели, т. е. изменить структуру модели. Для этого, применяя итерационную процедуру (7) (простейший метод Эйлера), устремим параметры μ и *K* к большим значениям, допустим 300.

В ходе этих превращений получаем следующий набор параметров модели:

$$\overline{X}_1 = 1,0, \quad \overline{X}_2 = 0,11, \quad a = 0,15, \quad A_0 = 1,84, \quad \mu = 300, \quad K = 300, \quad m = 1.$$

Причем собственные значения полученной модели равны: $\lambda_{1,2} = -0,0748 \pm 0,34549i$. Незначительное расхождение величин собственных значений отражает несовершенство вычислительной итерационной процедуры. Большие значения параметров μ и *K* приводят к тому, что вкладом переменной в знаменателе формулы Моно можно пренебречь и вместо дробно-рациональной зависимо-

сти
$$\left(\frac{\mu X_1 X_2}{K + X_1}\right)$$
 подставить выражение $(X_1 X_2)$:

$$\begin{cases}
\dot{X}_1 = a (A_0 - X_1 - X_2) X_1 - X_1 X_2, \\
\dot{X}_2 = X_1 X_2 - m X_2.
\end{cases}$$
(86)

Тем самым мы построили структурно отличную модель, подобную исходной по устойчивости к малым возмущениям. Рис. 1 иллюстрирует влияние преобразований на вид фазового портрета. Можно видеть, что поведение системы в окрестности особой точки не претерпевает заметных изменений, не говоря уже о сохранении типа особой точки — устойчивого фокуса.

Отметим, что подобие по равенству собственных значений является только примером. Оно представляет собой достаточно жесткое требование. Можно использовать другие ограничения. Например, можно использовать формулы, используемые для построения границ параметрических портретов систем второго порядка [Иваницкий, Кринский, Сельков, 1978]: (1) зафиксированный след матрицы линейного приближения (Sp = const) позволит построить системы со схожим типом устойчивости, но произвольным типом поведения в окрестности особой точки (узел или фокус); (2) фиксация только детерминанта (Δ = const) «замораживает» количество стационарных состояния (одно или три); (3) а фиксация величины $\frac{1}{4}$ Sp² – Δ = const задает подобие моделей по наличию осцилляций (фокус) вокруг устойчивой или неустойчивой особой точки. Саму константу



Рис. 1. Вид фазового портрета систем (8а), (8б) в окрестности стационарной точки. Обозначения: (а) соответствует нелинейный вариант системы, в которой $\mu = 2$ и K = 0.5; (б) соответствует модифицированная модель, в которой $\mu = 300$ и K = 300; (в) линейный вариант системы, в которой дробно-рациональное выражение заменено на билинейное

можно сделать варьируемой и использовать как параметр при инфинитезимальных преобразованиях, что позволит строить модели, подобные не равенством собственных значений, а именно общим типом поведения — например, устойчива система или нет. И, конечно, в качестве показателя подобия может быть выбрана любая величина, характеризующая важные для исследователя свойства экосистем.

Конечно, такое преобразование не всегда возможно. Например, нельзя было бы перевести нелинейную систему второго порядка, описывающую замкнутую экосистему с колебательным режимом, в линейную систему, поскольку в линейной системе второго порядка без запаздывания предельного цикла не бывает [Свирежев, 1987].

Специфика моделирования замкнутых экосистем и биосферы. Модели гибкого метаболизма. Парадокс Вернадского–Дарвина

В современных условиях роста антропогенного давления на экосистемы и биосферу огромное значение имеет обеспечение понимания, прогноза и управления природными экологическими системами. Близко к этой задаче примыкает задача создания искусственных биосфер — замкнутых экологических систем жизнеобеспечения (ЗЭСЖО) космического применения. Огромное значение в достижении перечисленных задач имеет оценка устойчивости реальных экосистемы можно получить только в экспериментах, приводящих к разрушению этой экосистемы, то очевидно, что экспериментальный подход бесполезен для достижения заявленной цели. Единственный способ оценки устойчивости экосистем — построение и исследование их теоретических моделей. Однако модельный подход к оценке устойчивости реальных экосистем.

Одним из важнейших препятствий является противоположный ход зависимостей устойчивости экосистемы от числа входящих в нее видов в случае реальных экосистем и их классических математических моделей. Действительно, с одной стороны, в традиционных моделях экосистем при увеличении количества взаимодействующих видов уменьшается область устойчивости в пространстве параметров модели [Адамович, Дегерменджи, 1985; Мау, 1971]. Кроме того, существует принцип конкурентного исключения [Гаузе, 1933], гласящий, что число стационарно существующих на одном трофическом уровне видов не может превышать числа доступных им питательных субстратов [Дегерменджи, Абакумов, 2018].

В дальнейшем принцип конкурентного исключения был расширен. Показана возможность сосуществования нескольких видов на одном питательном субстрате, если их число не превышает количество плотностнозависимых контролирующих рост факторов (ПКРФ) в системе [Дегерменджи, Печуркин, Шкидченко, 1979]. Кроме питательных субстратов к ПКРФ относят вещества, угнетающие или стимулирующие рост, а также поедание хищником [Одум, 1982].

При поиске критерия сосуществования видов было открыто существенное парадоксальное свойство ПКРФ — аутостабилизация, заключающаяся в независимости или малой изменчивости стационарных значений ПКРФ внутри системы (в культиваторе) при вариабельности их входных потоков [Дегерменджи, Печуркин, Шкидченко, 1979].

В основе этого эффекта лежит механизм обратных метаболических связей отдельных видов микробного сообщества между собой, реализуемых через конкретные биохимические факторы среды — ПКРФ. Мерой независимости фоновой концентрации ПКРФ от входной (т. е. мерой аутостабилизации) служат коэффициенты чувствительности (K_j): отношение изменения стационарного уровня каждого ПКРФ на единицу изменения входного уровня ПКРФ: $K_j \equiv \frac{\partial A_j}{\partial A_j^0}$. На большом числе экспериментов доказано, что эффект аутостабилизации присущ процессам периодического и непрерывного культивирования микроорганизмов, взаимодействующим популяциям одного трофического уровня, взаимодействиям «хищник–жертва» и некоторым водным экосистемам.

Доказана теорема [Адамович, Терсков, Дегерменджи, 1987], что сумма K_j по всем ПКРФ в точности равна **целому** (!) числу, которое есть разность числа ПКРФ (*n*) и числа сосуществующих популяций (*m*), т. е.

$$\sum_{j=1}^{n} \frac{\partial A_j}{\partial A_j^0} = n - m.$$
⁽⁹⁾

Доказано [Адамович, Терсков, Дегерменджи, 1987] следствие этой теоремы о «целочисленности» изменения стационарных уровней биомасс:

$$\sum_{i=1}^{m} \sum_{j=1}^{n} a_{ji} \frac{\partial X_i}{\partial A_j^0} = -n.$$

Эта теорема получила название «теорема квантования», поскольку сумма коэффициентов чувствительности *K_i* может меняться лишь дискретно и целочисленно.

Экспериментальная проверка этого утверждения на двухвидовой дрожжевой системе показала ее полную справедливость. Теорема открывает путь к экспериментальному определению числа сосуществующих микробных популяций, не отличимых морфологически. Теорема квантования представляет собой редкий случай теоретически точно выведенного инварианта или «закона экологии» для целой экосистемы, полученного для сообщества, связанного достаточно общей и сложной сетью «плотностнозависимых» взаимодействий. Применение формулы (9) на практике позволяет судить о степени полноты наших знаний о системе взаимодействий между популяциями сообщества в рамках достаточно общих предположений о «ростовой» и возрастной структуре каждой популяции. С другой стороны, в руках исследователя оказывается новый неоценимый «измеритель» этой «организационной» целостности: только то сообщество, для которого выполняется эта формула (т. е. найдены все ПКРФ), может считаться «замкнутым» по регуляции, т. е. механизм устойчивости которого полностью понят и объяснен.

В то же время экспериментальные данные свидетельствуют, что в природных экосистемах принцип конкурентного исключения может не соблюдаться. Наиболее известный пример нарушения принципа конкурентного исключения — парадокс планктона, заключающийся в сосуществовании нескольких видов планктона, питающихся одним питательным субстратом [Hutchinson, 1961]. Данное явление наблюдается не только в водных, но и в наземных экосистемах [Levine, HilleRisLambers, 2009]. Возрастание устойчивости реальных экосистем с увеличением числа входящих в нее видов является типичным [Свирежев, 1978; Winemiller, 1990; Polis, 1991], однако встречаются и более редкие случаи обратной зависимости. Так, в работе [Ives, Carpenter, 2007] приведен краткий обзор 52 эмпирических исследований и в 69 % исследований показана положительная корреляция видового разнообразия и стабильности экосистемы. В 14 % случаев — отрицательная корреляция.

Тем не менее очевидная тенденция налицо, и это расхождение в зависимости устойчивости реальных экосистем и их моделей от численности видов является проблемой принципиальной важности, без разрешения которой нельзя ставить вопрос о практическом использовании моделей, поскольку такого рода расхождение указывает на то, что нечто очень существенное не так в моделях экосистем.

В дополнение к вышеперечисленным претензиям к традиционным математическим моделям экосистем, еще одной проблемой является их неспособность описывать замкнутые экологические системы (ЗЭС) [Bartsev, 2004]. Проиллюстрируем это ограничение на примере простой модели ЗЭС.

В соответствии с задачей в дальнейшем будет рассматриваться только стационарное состояние ЗЭС. Это позволяет упростить форму записи исходной системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \dot{X}_{i} = \alpha_{ii}V_{i} - \sum_{j=1}^{N} \alpha_{ij}V_{j} \equiv 0, \\ \dot{S}_{k} = \sum_{l=1}^{N} \alpha_{kl}V_{l} - \sum_{r=1}^{N} \alpha_{kr}V_{r} \equiv 0 \end{cases}$$
 (10)

где $V_i = f_i(\vec{X}^*, \vec{S}^*)X_i^*$ и звездочкой помечены стационарные значения переменных ЗЭС, где скорости процессов трансформации веществ на единицу биомассы обозначены как $f_i(\vec{X}, \vec{S})$; N — количество видов; X_i обозначают биомассу продуцентов и консументов; α_{ii} равен экономическому коэффициенту по приросту биомассы.

Тем самым у нас имеется набор переменных V_i , количество которых равно числу видов, существующих в замкнутой системе. Кроме того, количество уравнений системы равно количеству видов плюс количество биогенов, участвующих в круговороте. Нетривиальное решение возможно, если ранг (количество линейно независимых строк) матрицы **A** меньше числа переменных. Однако существует возможность, которая обязательно должна быть проверена, что в составленных подобным образом моделях экосистем некоторые уравнения являются линейно зависимыми и стационарное состояние, т. е. нетривиальное решение, в модели существует. Проверим эту возможность прямой иллюстрацией.

Рассмотрим условия существования стационарного состояния замкнутой экосистемы на примере простой системы, состоящей из двух продуцентов (X_1, X_2) и одного консумента (X_3) . В системе присутствуют потоки биомассы, кислорода (4-я переменная), углекислого газа (5-я переменная) и воды (6-я переменная). Отсутствие в системе редуцентов соответствует предположению, что погибший организм очень быстро минерализуется. Соответствующая система дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = \alpha_{11}V_1 - \alpha_{13}V_3, \\ \frac{dX_2}{dt} = \alpha_{22}V_2 - \alpha_{23}V_3, \\ \frac{dX_3}{dt} = \alpha_{33}V_3 - \alpha_{34}V_4, \\ \frac{dO}{dt} = \alpha_{41}V_1 + \alpha_{42}V_2 - \alpha_{43}V_3 - \alpha_{44}V_4, \\ \frac{dC}{dt} = -\alpha_{51}V_1 - \alpha_{52}V_2 + \alpha_{53}V_3 + \alpha_{54}V_4, \\ \frac{dH}{dt} = -\alpha_{61}V_1 - \alpha_{62}V_2 + \alpha_{63}V_3 + \alpha_{64}V_4. \end{cases}$$
(11)

Учет химических превращений веществ требует описания элементарного состава участников круговорота. В нашем простейшем примере рассматриваются всего три химических элемента: кислород, углерод и водород. Химический состав может быть представлен через матрицу массовых долей (квот):

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} 1 & 0.73 & 0.89 & 0.30 & 0.20 & 0.25 \\ 0 & 0.27 & 0 & 0.60 & 0.65 & 0.55 \\ 0 & 0 & 0.11 & 0.10 & 0.15 & 0.20 \end{pmatrix} \leftarrow \begin{cases} \mathbf{O} \\ \mathbf{C} \\ \mathbf{H} \\ \mathbf{O}_2 \end{cases}$$

где в столбцах X_i представлен абстрактный химический состав некоторых условных видов.

Химический состав видов выбран совершенно произвольно. На данном этапе рассмотрения это представляется вполне обоснованным. В противном случае придется предполагать, что химический состав организмов участвовал в эволюционном процессе замкнутой системы как целого. Возможность этого варианта рассматривается в подразделе, посвященном парадоксу Вернадского– Дарвина.

Чтобы получить стехиометрические коэффициенты для уравнений системы, мы должны использовать описание чистого (нетто) превращения веществ. Например, фотосинтез продуцента 1 можно записать как:

$$v_1 \text{CO}_2 + v_2 \text{H}_2 \text{O} \rightarrow v_3 X_1 + v_4 \text{O}_2.$$

Для определения стехиометрических коэффициентов необходимо решить соответствующее матричное уравнение:

$$v_1 \begin{pmatrix} 0,73\\0,27\\0 \end{pmatrix} + v_2 \begin{pmatrix} 0,89\\0\\0,11 \end{pmatrix} = v_3 \begin{pmatrix} 0,30\\0,60\\0,10 \end{pmatrix} + v_4 \begin{pmatrix} 1\\0\\0 \end{pmatrix}.$$

Нормированное на 1 решение этого уравнения имеет вид: $v_1 = -0,71$, $v_2 = -0,29$, $v_3 = 0,32$, $v_4 = 0,68$. Следовательно, мы можем заполнить первый столбец в матрице коэффициентов модели, а затем подобной процедурой и все остальные столбцы:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} V_1 & V_2 & V_3 & V_4 \\ 0,32 & 0 & -0,18 & 0 \\ 0 & 0,27 & -0,25 & 0 \\ 0 & 0 & 0,18 & -0,26 \\ 0,68 & 0,73 & -0,57 & -0,74 \\ -0,71 & -0,64 & 0,64 & 0,53 \\ -0,29 & -0,36 & 0,18 & 0,47 \end{pmatrix} \leftarrow \begin{cases} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ O_2 \\ CO_2 \\ H_2O \end{cases}$$

Наличие закона сохранения и нормировка на единицу понижают ранг матрицы до 4, но поскольку нетривиальное решение однородной системы линейных уравнений существует только, когда ранг матрицы коэффициентов меньше количества переменных, то из этого следует, что данная модель не имеет нетривиального стационарного состояния и, значит, не может быть использована для моделирования ЗЭС. Аналогичные расчеты были проведены для других экосистем и дали тот же результат.

Если проанализировать этот результат, то можно сделать вывод, что все дело в независимости и несогласованности (линейной независимости) стехиометрических коэффициентов. Действительно, традиционные экологические модели типа Лотки–Вольтерра аналогичны моделям химических реакций в смысле использования постоянных стехиометрических коэффициентов. Такие модели можно назвать моделями с жестким метаболизмом — ЖМ-моделями. Пока учитывается только один биоген и переменные выражены в единицах массы лимитирующего химического элемента (например, фосфорные или азотные единицы [Свирежев, 1987, с. 244]), принципиальных проблем нет. Однако в замкнутых условиях мы должны учитывать превращения всех задействованных химических соединений, чтобы предотвратить образование тупиков.

Отсюда следует, что необходимо перейти к моделям, основанным на гипотезе о лабильности стехиометрических коэффициентов, которые могут быть названы моделями с гибким или адаптивным метаболизмом [Салтыков, Барцев, Ланкин, 2011; Saltykov, Bartsev, Lankin, 2012; Saltykov, Bartsev, 2017; Bartsev, Degermendzhi, Sarangova, 2019] — ГМ-моделями.

Примером возможной модификации традиционных моделей является введение механизма «переключения хищника» («predator switching»), что приводит к увеличению области устойчивости модели [Pelletier, 2000]. Из общих соображений следует предположить, что эта модификация не единственно возможная и требуется сформулировать набор возможных механизмов, позволяющих улучшить описательную возможность моделей экосистем. В различных условиях и для разных экосистем ведущую роль могут играть разные механизмы или их комбинации из этого набора.

В нашем обсуждении свойств ГМ-моделей механизмы гибкого метаболизма будут сначала описаны на самом общем, феноменологическом уровне уровне поведения, а затем спустимся вниз, к уровню физиологических и биохимических механизмов. В данном исследовании рассматривается замкнутая экосистема с двумя трофическими уровнями — продуцентами и консументами. Процесс разложения мертвых потребителей считается быстрым по сравнению с темпами роста организмов. Референсная ЖМ-модель имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dx_1}{dt} = \left(V_1 B - \frac{\mu_0 y}{K + x_1 + x_2}\right) x_1, \\ \frac{dx_2}{dt} = \left(V_2 B - \frac{\mu_0 y}{K + x_1 + x_2}\right) x_2, \\ \frac{dy}{dt} = \left(\sum_{i=1}^2 \frac{\mu_0 x_i}{K + x_1 + x_2} - k_d\right) y, \\ B = B_0 - x_1 - x_2 - y, \end{cases}$$
(12)

где x_i — продуценты; y — консумент; V_i — удельная скорость роста продуцента; B_0 — общее количество лимитирующего элемента в системе; μ_0 — максимальная удельная скорость поедания продуцента консументом; K — константа Моно; k_d — константа отмирания.

На рис. 2, *а* показана динамика переменных ЖМ-модели при указанных значениях параметров. Наблюдается автоколебательный режим после очень быстрой элиминации одного из продуцентов, вследствие различий удельной скорости роста.



Рис. 2. Динамика ЖМ- (а) и ГМ-модели (б) при значениях параметров: $V_1 = 1$, $V_2 = 1,5$, $B_0 = 1,5$, $\mu_0 = 2$, K = 0,5, $k_d = 0,5$

Первая ГМ-модель (13) называется условно «Разборчивый хищник» и представляет собой предыдущую модель, в которой хищник потребляет преимущественно ту жертву, численность которой выше. Это можно интерпретировать как некоторый принцип экономии — вероятность поймать жертву выше в тех местах, где больше их численность.

$$\frac{dx_{1}}{dt} = \left(V_{1}B - \frac{\mu_{0}y}{K + x_{1} + x_{2}}\left(\frac{x_{1}}{x_{1} + x_{2}}\right)\right)x_{1},$$

$$\frac{dx_{2}}{dt} = \left(V_{2}B - \frac{\mu_{0}y}{K + x_{1} + x_{2}}\left(\frac{x_{2}}{x_{1} + x_{2}}\right)\right)x_{2},$$

$$\frac{dy}{dt} = \left(\sum_{i=1}^{2} \frac{\mu_{0}x_{i}}{K + x_{1} + x_{2}}\left(\frac{x_{i}}{x_{1} + x_{2}}\right) - k_{d}\right)y,$$

$$B = B_{0} - x_{1} - x_{2} - y.$$
(13)

При тех же значениях параметров модель демонстрирует другое поведение (рис. 2, δ) — отсутствуют автоколебания численности и, что очень важно, сосуществуют оба вида продуцентов, потребляющих один и тот же субстрат. Качественно, и в какой-то мере количественно, различие в устойчивости модели можно видеть на параметрическом портрете системы (рис. 3), полученном прямым счетом.



Рис. 3. Параметрические портреты ЖМ-модели (слева) и ГМ-модели (справа) при значениях параметров: $V_2 = 1,5$, $\mu_0 = 2$, K = 0,5, $k_d = 0,5$

Вторая ГМ-модель называется «Переключающиеся пути» и построена на основе следующих соображений. Живые организмы могут переключать свои

метаболические пути в зависимости от наличного субстрата. Например, организм может использовать в качестве энергетического субстрата или углеводы, или жиры, или белки, окисляя их через соответствующие метаболические пути.

Прямое моделирование такого рода переключений внутри каждого организма возможно, но связано с огромными вычислительными затратами. Поэтому были приняты следующие упрощающие предположения:

1. Активное состояние данного метаболического пути ассоциируется с соответствующим трофическим состоянием организма. Каждый организм может находиться только в одном трофическом состоянии. Например, организм может использовать в качестве энергетического субстрата только углеводы.

2. Организм может изменять свое трофическое состояние в зависимости от концентрации (численности) соответствующего питательного субстрата, т. е. хищник переходит в то трофическое состояние, которое соответствует превалирующему типу энергетического субстрата жертвы.

Модель имеет следующий вид:

ſ

$$\begin{vmatrix} B = B_0 - \sum_k x_k - \sum_k \sum_j y_{jk}, \\ \frac{dx_i}{dt} = V_i B x_i - \sum_j \frac{\mu_{ji} x_i}{K_{ji} + x_i} y_{ji}, \\ \frac{dy_{ji}}{dt} = \frac{\mu_{ji} x_i}{K_{ji} + x_i} y_{ji} - k_{dj} y_{ji} - \sum_{k \neq i} \gamma_{jk} x_k y_{ji} + \sum_{i \neq k} \gamma_{ji} x_i y_{ki}, \end{vmatrix}$$
(14)

где обозначения соответствуют обозначениям предыдущей модели, добавлены только параметры γ_{ij} — константы скорости перехода.

На этой модели был проверен эффект изменения устойчивости с ростом количества продуцентов. Было показано, что виды не вымирают, а с ростом количества продуцентов уменьшается область автоколебаний.

Для описания ЗЭС с учетом нескольких биогенов и возможностью переключения между лимитирующими факторами была предложена ГМ-модель, названная «Внутренний регуляторный пул». Для наглядности рассмотрим случай двух биогенов. Продуценты и консументы в этой модели представлены однообразно (рис. 4). Организм потребляет извне питательные соединения, если это автотроф, то это соли с различным содержанием биогенов, например, азота и фосфора, а если это гетеротроф, то в качестве питания выступают автотрофы с определенным соотношением биогенов. Согласно модели питательные веще-

ства с определенными соотношениями биогенов $\left(\frac{\alpha_i}{\beta_i} = \text{const}_i\right)$, попадая в орга-

низм, расщепляются и распределяются в пулы, обозначенные буквами а и b. Из

этих пулов они идут на синтез биомассы, имеющей генетически предопределенное соотношение этих биогенов $\frac{\alpha_0}{\beta_0} = \text{const.}$



Рис. 4. Схематическое представление ГМ-модели «Внутренний регуляторный пул»

Соответствующая математическая модель имеет следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dX_{1}}{dt} = \mu_{1}a_{1}b_{1}X_{1} - k_{1}X_{1}Y(a^{m} - a) - k_{1}X_{1}, \\ \frac{da_{1}}{dt} = k_{A1}A(a_{1}^{m} - a_{1}) - \alpha_{1}\mu_{1}a_{1}b_{1}, \\ \frac{db_{1}}{dt} = k_{B1}B(b_{1}^{m} - b_{1}) - \beta_{1}\mu_{1}a_{1}b_{1}, \\ \frac{dX_{2}}{dt} = \mu_{2}a_{2}b_{2}X_{2} - k_{2}X_{2}Y(b^{m} - b) - k_{2}X_{2}, \\ \frac{da_{2}}{dt} = k_{A2}A(a_{2}^{m} - a_{2}) - \alpha_{2}\mu_{2}a_{2}b_{2}, \\ \frac{db_{2}}{dt} = k_{B2}B(b_{2}^{m} - b_{2}) - \beta_{2}\mu_{2}a_{2}b_{2}, \\ \frac{dY}{dt} = \mu abY - k_{d}Y, \\ \frac{da}{dt} = k_{1}X_{1}(a^{m} - a)\alpha_{1} + k_{2}X_{2}(b^{m} - b)\alpha_{2} - \alpha_{0}\mu ab, \\ \frac{db}{dt} = k_{1}X_{1}(a^{m} - a)\beta_{1} + k_{2}X_{2}(b^{m} - b)\beta_{2} - \beta_{0}\mu ab, \\ A = A_{0} - a_{01}X_{1} - a_{02}X_{2} - a_{0}Y, \quad B = B_{0} - b_{01}X_{1} - b_{02}X_{2} - b_{0}Y, \end{cases}$$
(15)

где $a_{(1,2)}$ и $b_{(1,2)}$ — элементы из внутреннего регуляторного пула (ВРП); $a^{m}_{(1,2)}$ и $b^{m}_{(1,2)}$ — емкости ВРП; $k_{(A1,B1,A2,B2,1,2)}$ — константы поглощения; $\mu_{(1,2)}$ — удельные скорости роста; $k_{(d1,d2,d)}$ — константы отмирания.

Анализ устойчивости этой модели показал, что она обладает устойчивостью в широкой области параметров и демонстрировать параметрический портрет просто бессмысленно — он однороден. В то время, как в модели с жестким метаболизмом стационарное состояние существует только при точном равенстве удельных скоростей роста продуцентов, что является негрубым случаем и не может быть реализовано в реальности.

Резюмируя можно утверждать, что экологические модели с гибким метаболизмом, с одной стороны, предлагают возможное разрешение парадокса планктона и обеспечивают соответствие между реальными и модельными зависимостям устойчивости экосистем от количества видов, а с другой, могут быть использованы для моделирования замкнутых экологических систем.

Наличие высокого уровня замкнутости потоков биогенов в биосфере и необходимость глобальной сбалансированности этих потоков для обеспечения длительного существования биосферы выводят нас на интересный парадокс. Впервые одну из сторон парадокса озвучили Barlow и Volk (1990), назвав его именем Вернадского. Они представили его/ее в двух вопросах: «Как совокупность организмов, являющихся открытыми системами, может эволюционировать и сохраняться в течение миллиардов лет в глобальной системе, которая в значительной степени закрыта для притока и оттока материи?» и «Как входы и выходы бесчисленных открытых систем образуют жизненную сеть таким образом, что материальное замыкание, как граничное условие планеты, не разрушает ее организацию?». Эту проблему можно проиллюстрировать следующим образом (рис. 5).



Рис. 5. Несоответствие элементного состава организмов с неизбежностью приводит к образованию отходов. На рисунке *a*, *б*, *в* — различные биогены, например, фосфор, азот, углерод

Допустим, у нас имеются два организма из двух смежных трофических уровней, т. е. один организм потребляется другим. Состав биомассы организмов определяется генетически и фиксирован на временах нашего рассмотрения. Предположение, что долевой состав биомассы разных организмов различен, иначе бы они не были разными организмами. Тогда получается, что организмконсумент может утилизировать в собственную биомассу только часть потребляемой биомассы, оставшаяся часть, лишенная одного из биогенов, перейдет в отходы (тупик).

Конечно, образовавшиеся органические отходы могут быть утилизированы другим организмом, но только частично по той же причине различий в элементном составе. В целом можно представить целую сеть взаимодействующих организмов из разных трофических уровней, но задача согласования потоков остается, если предположить, что генетически задаваемый элементный состав организма сформировался независимо от всей трофической системы. А если допустить, что элементный состав организма, который определяет и стехиометрические соотношения в потоке веществ, формировался в ходе эволюции биосферы, то мы приходим к несколько более широкой формулировке парадокса, который можно назвать парадоксом Вернадского–Дарвина (Bartsev, Degermendzhi, Sarangova, 2019].

Учитывая, что нынешнее высоко-замкнутое состояние биосферы является результатом ее эволюционного развития, рассматриваемый парадокс можно сформулировать следующим образом: «Замкнутость биосферы не является приспособительным признаком особи (вида)».

Естественный отбор ведет к успеху организма с преимуществом, которое обеспечивает захват ресурсов и порождение потомков здесь и сейчас. Совсем непонятно, какие механизмы могут направлять эволюцию в сторону повышения замкнутости биосферы в целом, как заставить заботиться о будущем организм, имеющий только ближайшие цели — выжить и дать потомство.

Рассмотрим, как этот парадокс мог быть разрешен на заре появления биосферы. Появление цианобактерий, способных к кислородному фотосинтезу, произошло ~ 2,5 млрд лет назад. Это событие дало начало периоду, названному Великим Окислением (BO) [Judson, 2017; Lyons, Reinhard, Planavsky, 2014]. Концентрация кислорода начала расти с начальной 10^{-5} -й доли текущего уровня атмосферного кислорода и достигла 0,1–1 % от текущего уровня ~2 млрд лет назад. Во время Великого Окисления биосфера лишь зародилась. Жизнь на Земле существовала в виде бактериальных матов, представляющих собой слабо связанные между собой локальные экосистемы.

То, что в течение 1,5 млрд лет концентрация O_2 в атмосфере не менялась, означает, что скорости фотосинтеза и минерализации органики были точно сбалансированы. Постоянство запасов органики при концентрации O_2 в атмосфере чуть выше точки Пастера; это означает, что внутри бактериальных матов была повышенная концентрация O_2 , обеспечивающая быстрое разложение мертвой биомассы и поставку биогенов обратно фотоавтотрофам. То есть бактериальные

сообщества были высоко-замкнутыми системами, в то время как биосфера, несмотря на общую сбалансированность материальных потоков, была системой со слабыми глобальными связями, т. е. еще не совсем системой — «неконсолидированной» биосферой.

Рассмотрим модель бактериального мата с учетом стехиометрических пропорций двух биогенов в биомассе бактерий. Скорость роста биомассы автотрофа X_1 определяется концентрацией биогенов (A и B) в окружающей среде и описывается формулой Митчерлиха [Митчерлих, 1957]. Поскольку хищников еще нет, мы вводим отмирание биомассы, которая переходит в детрит двух типов, а именно D_A и D_B , который затем потребляется гетеротрофом X_2 . Гетеротроф минерализует детрит, превращая его в собственную биомассу, и лизируя биомассу мертвых гетеротрофных бактерий.

Анализ модели привел к более чем ожидаемому результату. Оказалось, что если в системе имеется всего один гетеротрофный организм, то для существования стационарного состояния необходимо, чтобы соотношения биогенов в составе биомассы продуцента и редуцента совпадали, т. е. это должны быть генетически идентичные организмы. Очевидно, что организмы, реализующие разные функции, не могут иметь одинаковую структуру и, следовательно, идентичный элементный состав, определяемый генетикой.

Один из возможных способов разрешения парадокса Вернадского–Дарвина на уровне бактериального мата — предположить, что трофический уровень редуцента включает, по крайней мере, два вида с различным стехиометрическим составом. Выясним, каким условиям должен удовлетворять стехиометрический состав этих редуцентов в бактериальном мате. В этом случае модель принимает следующий вид:

$$1) \frac{dX_{1}}{dt} = \mu_{1} \frac{AB}{AB + K_{1}} X_{1} - m_{1} X_{1}^{2},$$

$$2) \frac{dD_{A}}{dt} = a_{1}m_{1}X_{1}^{2} - \mu_{2}a_{2} \frac{D_{A}D_{B}}{D_{A}D_{B} + K_{2}} X_{2} - \mu_{3}a_{3} \frac{D_{A}D_{B}}{D_{A}D_{B} + K_{3}} X_{3},$$

$$3) \frac{dD_{B}}{dt} = b_{1}m_{1}X_{1}^{2} - \mu_{2}b_{2} \frac{D_{A}D_{B}}{D_{A}D_{B} + K_{2}} X_{2} - \mu_{3}b_{3} \frac{D_{A}D_{B}}{D_{A}D_{B} + K_{3}} X_{3},$$

$$4) \frac{dX_{2}}{dt} = \mu_{2} \frac{D_{A}D_{B}}{D_{A}D_{B} + K_{2}} X_{2} - m_{2}X_{2}^{2},$$

$$(16)$$

$$5) \frac{dX_{3}}{dt} = \mu_{3} \frac{D_{A}D_{B}}{D_{A}D_{B} + K_{3}} X_{3} - m_{3}X_{3}^{2},$$

$$6) A_{0} = A + a_{1}X_{1} + a_{2}X_{2} + a_{3}X_{3} + D_{A},$$

$$7) B_{0} = B + b_{1}X_{1} + b_{2}X_{2} + b_{3}X_{3} + D_{B}.$$

Проведя простые расчеты, получаем, что в стационарном состоянии между биомассой редуцентов должно соблюдаться следующее соотношение:

$$\overline{X}_2^2 = \overline{X}_3^2 \frac{m_3}{m_2} \left(\frac{a_3 b_1 - a_1 b_3}{a_1 b_2 - a_2 b_1} \right).$$

Это выражение имеет смысл, когда выражение в скобках положительно, что имеет место при следующих соотношениях:

$$\frac{a_2}{b_2} < \frac{a_1}{b_1} < \frac{a_3}{b_3}$$
 или $\frac{a_2}{b_2} > \frac{a_1}{b_1} > \frac{a_3}{b_3}$.

Эти соотношения, в отличие от строгого равенства, вполне могли реализоваться в бактериальном мате. Вычислительные эксперименты подтвердили возможность существования устойчивых стационарных состояний в модели бактериального мата (рис. 6).



Рис. 6. Формирование устойчивых стационарных состояний численностей организмов в бактериальном мате

Простая модель позволяет выдвинуть гипотезу о том, что в бактериальных замкнутых системах количество гетеротрофных видов должно быть не меньше количества биогенов.

Парадокс Вернадского–Дарвина может быть разрешен другим способом система должна содержать несколько автотрофов и одного гетеротрофа, способного выбирать добычу, т. е. это должен быть хищник, модель (12), рассмотренная выше. Появление хищников — это начало перехода в «зрелую» биосферу. Важно, что сложные сети питания со многими типами потребителей отсутствовали на Земле до тех пор, пока не появились первые животные.

Можно сказать, что биосфера наконец созрела, стала очень замкнутой и системной, в полном смысле этого слова, всего за 300 млн лет до настоящего времени. Большое разнообразие организмов и разветвление пищевой сети биосферы предотвращали образование так называемых тупиков, т. е. веществ, которые не потребляются другими организмами. Тонкая подстройка пищевой сети может происходить посредством гибкого метаболизма, в конечном итоге разрешающего парадокс Вернадского–Дарвина.

Минимальная модель биосферы. Принцип наихудшего сценария

На фоне продолжающихся споров о реальности глобального потепления и о его антропогенной природе появляются работы, из которых следует, что наблюдаемые сейчас глобальные тренды направлены в противоположную сторону от ожидаемых по естественной динамике климата [Marcott et al., 2013]. Отмечено, что за последние 2000 лет только в XX и XXI веках наблюдается беспрецедентное когерентное (98 % регионов земного шара) повышение глобальной температуры [Neukom, 2019]. Обсуждается возможность резкого переключения системы «биосфера-климат» (СБК) в другое, вероятнее всего, более горячее состояние [Drijfhout et al., 2015; Lenton et al., 2019; Lucarini, Bódai, 2017; Steffen et al., 2018]. Однако следует отметить, что возможность такого переключения и возможные его механизмы были рассмотрены в ИБФ СО РАН 15 лет назад [Барцев, Дегерменджи, Ерохин, 2005] на примере малоразмерных концептуальных моделей биосферы, а практическое обоснование построения таких моделей под названием «Принцип наихудшего сценария» было сформулировано в 2008 году [Bartsev, Degermendzhi, Erokhin, 2008]. Рассмотрим, на основе каких идей была озвучена возможность резких катастрофических изменений, и какую роль в построении минимальных моделей играет вышеупомянутый принцип.

Неточность и неадекватность сложных моделей есть следствие в первую очередь: (1) невозможности оценить все параметры распределенной модели; (2) принципиальной неточности любого измерения, что приводит к многократ-

ному (по числу параметров модели) и неконтролируемому росту ошибки в многомерных моделях и, в результате, к неопределенному прогнозу.

Важно отметить, что любые вычисленные сценарии биосферной динамики могут быть только вероятностными. Причина заключается в том, что оценки почти всех параметров биосферы и климата имеют приближенный характер. Так, например, оценки количества углерода в атмосфере варьируют от 600 до 760 Гт; в биомассе — от 500 до 850 Гт; в почве — от 1080 до 2000 Гт; первичная продукция фотосинтеза варьирует в диапазоне 110–120 ГтС/год [Кондратьев, Крапивин, 2004; Семенов, 2004; IPCC Climate Change, 2001; Brovkin et al., 2004]. Наиболее вероятное значение одного из важнейших параметров системы «биосфера–климат» — чувствительности климата, равного повышению глобальной температуры при удвоении атмосферной концентрации CO_2 , равно 4,5 °C [IPCC, Climate Change, 2007], однако по некоторым оценкам этот параметр может достигать 11 °C [Stainforth et al., 2005]. По это причине можно говорить о целом **веере** возможных вариантов динамики системы «биосфера–климат».

И тогда возникает вопрос, а на какой сценарий ориентироваться лицам, принимающим решения, если забота о будущем земной биосферы и людей, живущих в ней, будет воплощаться не в словах, а в делах. Хочется привести простую аналогию. Допустим, сидит себе человек дома, скажем, телевизор смотрит и вдруг чувствует запах гари. Какова реакция нормального человека? Вскочить и найти источник гари. Если это бумагу в урне дети подожгли, то он спокойно вернется к прерванному делу. Важно, что он не дожидается очевидных доказательств пожара, прекрасно понимая, что потом уже может быть поздно. Подобная ситуация наблюдается и с глобальным изменением климата. Разница в том, что возможные последствия пожара всем известны, они не страдают неопределенностью и не требуют дополнительных научных исследований. Человек сразу допускает возможность наихудшего сценария развития пожара и поэтому начинает действовать сразу, бросая все.

Предполагается, что в отношении глобального потепления нужно поступать подобным образом — определить **наихудший сценарий** и оценить условия его осуществления при неблагоприятных условиях. Согласно **принципу наихудшего сценария** в случае неопределенности в оценке параметров мы должны выбирать наихудшее сочетание значений этих параметров, остающихся, тем не менее, внутри доверительных интервалов. Кроме того, если есть сомнения в эффективности того или иного природного компенсирующего негативную динамику механизма, то мы должны игнорировать этот механизм в создаваемых моделях. Тем самым последовательное применение принципа наихудшего сценария имеет своим результатом построение упрощенных моделей. Поскольку СБК принципиально нелинейная система, то с точки зрения наихудшего сценария особое внимание нужно обращать на систему обратных связей, в первую очередь положительных, и на цепочки отрицательных с четным количеством этих связей. Именно при наличии обратных связей возможны самые катастрофические сценарии — запуск глобальных самоускоряющихся процессов.

Даже предварительный, из общих соображений, анализ системы «биосфера-климат» на предмет наличия обратных связей приводит к следующей, достаточно сложной картине взаимодействий между главными процессами и событиями (рис. 7). Из рисунка видно, что даже на этом уровне моделирование столь сложной системы представляет собой нетривиальную задачу.



Рис. 7. Диаграмма наиболее очевидных обратных связей в системе «биосфера-климат»

Продолжая следовать принципу наихудшего сценария, выделим обратные связи, имеющие самые малые характерные времена, т. е. способные вызвать быстрые изменения в СБК. Один из ключевых механизмов взаимодействий «биосфера–климат» — это положительная обратная связь «температура – концентрация двуокиси углерода». Повышение атмосферной концентрации CO₂ вызывает вследствие парникового эффекта повышение приземной температуры, которое, в свою очередь, ведет к увеличению почвенного дыхания и выделению большего количества CO₂ — это первая быстрая обратная связь.

Вторая петля обратной связи включает уменьшение скорости фотосинтеза наземных растений вследствие смещения температуры от оптимального для

растений значения и, как следствие, уменьшение в потреблении атмосферного CO₂, что приводит к его дальнейшему росту и, в конечном счете, дальнейшему повышению температуры.

Начальная глобальная модель состоит из трех компартментов, между которыми происходит обмен углерода: атмосфера, наземные растения и мертвая органика. Эти компартменты взаимодействуют посредством трех процессов: роста, отмирания и распада органики. Модель также включает антропогенный источник углерода, который нарушает углеродный баланс в системе. Система уравнений модели имеет следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dC}{dt} = fuel(t), \\ \frac{dx}{dt} = \left[V_p(x_{\max} - x) \frac{A}{K_A + A} f_p(T) - V_d \right] \cdot x, \\ \frac{dy}{dt} = V_d \cdot x - V_s \cdot y \cdot f_M(T), \\ A = C - x - y, \\ f_i(T, T_{i\max}) = T^d(T_{i\max} - T), \\ T = T_o + T_{del} \cdot \log_2\left(\frac{A}{A_0}\right), \end{cases}$$
(17)

где x — количество углерода в биомассе растительного компартмента (ГтС); A — атмосферный углерод (ГтС); K_A — константа Моно по углероду; T среднегодовая глобальная приповерхностная температура; V_p , V_d , V_s — масштабные множители; x_{max} — предельное количество биомассы, зависящее от предельной допустимой плотности растительного покрытия (ГтС) ($x_{\text{max}} = x_0G$, где x_0 — количество наземной биомассы растений в конце 1950-х гг., G — коэффициент, характеризующий возможность растений увеличить количество биомассы); y — количество углерода в мертвой биомассе (Гт); $f_P(T)$, $f_M(T)$ функции, выражающие зависимость фотосинтеза и почвенного дыхания от температуры; A_0 — количество углерода в атмосфере в момент измерения средней приповерхностной температуры T_0 ; T_{del} — чувствительность климата, равная увеличению глобальной температуры при удвоении количества углерода.

Поскольку модель имеет нулевую размерность, то важнейший параметр — температура может быть только усредненной. Такой показатель существует, это среднегодовая глобальная приповерхностная температура, близкая в настоящее время к 15 °C. В модели предполагается, что глобальные изменения среднегодовой температуры ведут к такому же изменению в местной температуре. Поскольку фотосинтез и почвенное дыхание зависят от температуры атмосферы и относительно тонкого слоя земной поверхности, то это дает основания не учитывать в базовой модели температурную инерцию системы. Базовая модель не учитывает в явном виде влияние океана, поскольку влияние его глубинных слоев становится заметным на временах, превышающих предполагаемый диапазон прогноза. Однако действие океана учитывается неявно путем использования данных по чувствительности климата к удвоению CO₂ [IPCC, Climate Change, 2001, 2007].

Функция fuel(t), описывающая антропогенную эмиссию углерода вследствие сжигания ископаемых топлив, выражается эмпирической функцией, хорошо описывающей данные, предоставляемые Carbon Dioxide Information Analysis Center (http://cdiac.esd.ornl.gov).

Вопрос температурной зависимости почвенного дыхания является достаточно сложным. В некоторых исследованиях сообщалось, что повышение почвенной температуры не вызывает никакого увеличения эмиссии CO_2 из почвы [Fitter et al., 1999; Johnson et al., 2000; Liski et al., 1999]. С другой стороны, имеются исследования, которые доказывают положительную температурную зависимость почвенного дыхания [Rochette et al., 1999; Risk et al., 2002; Piao et al., 2008]. В соответствии с принципом наихудшего сценария был выбран пессимистичный вариант.

Различные оценки углеродного пула в атмосфере и наземных компартментах и потоков между ними представлены в литературе [Кондратьев, Крапивин, 2004; Семёнов, 2004; IPCC, 1996; IPCC Climate Change, 2001; Brovkin et al., 2002, 2004]. В соответствии с принципом наихудшего сценария были выбраны следующие значения параметров модели: начальное количество углерода в растительной биомассе — 850 ГтС и в неживой органике — 1100 ГтС.

Параметр K_A выбран равным 900 ГтС на основе экспериментальных данных [Pritchard et al., 2001; Morgan et al., 2001]. Эмпирическая зависимость роста среднегодовой глобально приповерхностной температуры от концентрации CO₂ была взята из опубликованных данных [Gifford, 1993].

Масштабные множители подбираются таким образом, чтобы скорость роста биомассы и интенсивность почвенного дыхания были равны ранее опубликованной оценке в 55 ГтС/г. Причем в отсутствие антропогенного потока CO₂ модель находится в стационарном состоянии с параметрами, соответствующими глобальным значениям конца 1950-х гг.

Окончательный выбор параметров определялся требованием соответствия динамике среднегодовой концентрации CO_2 в атмосфере, измерения которой начались в 1958 году на обсерватории Мауна Лоа [Keeling et al., 2001]. Нужно отметить, что хорошее соответствие между данными по сжиганию ископаемых топлив и данными Мауна Лоа достигается при значении параметра *G* внутри

диапазона 1,4–1,6, который близок к экспериментальным данным [Pritchard et al., 2001; Morgan et al., 2001].

Вычислительные эксперименты по моделированию будущей динамики углерода показывают, что при высоких темпах сжигания ископаемых топлив (сценарий A2 [IPCC, Climate Change, 2007]) модель предсказывает развитие катастрофических процессов, ведущих к необратимым изменениям в биосфере. Пример катастрофической динамики при G = 1,5 и $T_{del} = 4$ показан на рис. 8.



Рис. 8. Возможные сценарии изменений атмосферной концентрации углекислого газа в биосфере при различных датах полного прекращения выбросов (см. текст) при G = 1,5 и $T_{del} = 4:1$) 2107; 2) 2121; 3) 2125; 4) 2132. Пунктирный участок слева изображает данные Мауна Лоа

На рисунке различные кривые соответствуют различным датам, когда сжигание топлив полностью прекращено. Этот нереалистичный элемент введен для демонстрации того, что даже если сжигание топлив полностью прекращается, то существуют «даты необратимости», после которых катастрофический процесс в системе становится необратимым.

Расчеты показывают высокую чувствительность оцениваемых параметров возможных сценариев. Так, увеличение чувствительности климата на 1 градус приблизило наступление дат необратимости на 50 лет. Это может указывать на то, что оценка глобальных экологических рисков имеет очень высокую степень неопределенности, которая может быть уже не свойством моделей, а свойством самой системы, по аналогии с погодой.

Базовая модель позволяет заключить, что наиболее существенными параметрами, участвующими в запуске необратимых процессов, являются температурная зависимость скорости распада мертвой органики, способность растений поглощать избыток углерода (буферная емкость биоты) и чувствительность климата (подъем температуры при удвоении концентрации CO₂ в атмосфере).

Главный результат базовой модели заключается в демонстрации возможности катастрофических изменений в системе «биосфера–климат» и в оценке, пусть и очень грубой, «дат необратимости», характеризующих темпы этих изменений.

Ограниченность базовой модели и интегральная модель СБ

Область применимости базовой модели биосферы ограничена. А именно, для долговременного прогноза нельзя игнорировать вклад океана в глобальную динамику углерода. Принцип наихудшего сценария оправдывает игнорирование возможных компенсаторных механизмов, но он не дает оснований для игнорирования тех механизмов, чей компенсаторный эффект не вызывает сомнений, по крайней мере на современном уровне знаний.

Вклад океана может проявляться через растворение углекислого газа в воде, поглощение углекислого газа в процессе фотосинтеза морскими водорослями и тепловую инерцию водной массы. Компартментная схема потоков углерода в расширенной модели СБК приведена на рисунке 9.

Модель описывается следующей системой уравнений:

$$\frac{dA}{dt} = S(y, T(A)) + C_{a_up} BM_{out}(A) - P(x, A, T(A)) - -C_{a_down} AM_{in}(A) + fuel(t) + X(t)t),$$
(18.1)

$$\frac{dx}{dt} = P(x, A, T(A)) - D(x),$$
 (18.2)

$$\frac{dy}{dt} = D(x) - S(y, T(A)),$$
 (18.3)

$$\frac{dB}{dt} = C_{a_down} AM_{in}(A) - C_{a_up} BM_{out}(A).$$
(18.4)

В этой системе уравнение (18.1) описывает динамику атмосферной концентрации углерода, определяемую следующими процессами: фотосинтез, почвенное дыхание, поглощение поверхностным слоем океана ($C_{a_down}A$) и эмиссия с поверхности океана ($C_{a_up}B$), антропогенная эмиссия (fuel(e)), поток Хоутона (X(t)) [Houghton, 2003].



Рис. 9. Схема потоков углерода между компартментами, составляющими наземную и океаническую подсистемы круговорота углерода. На схеме: РНУ — растворенный неорганический углерод. Различие суммарных потоков углерода в наземную и океаническую подсистемы связано с постоянным поступлением антропогенного углерода, нарушающим равновесие

Уравнение (18.2), как и в базовой модели, описывает скорость изменения углерода в живой биомассе как результат фотосинтеза (P) и отмирания биомассь сы (D(x)).

Уравнение (18.3) описывает динамику углерода в мертвом органическом веществе как баланс между процессами отмирания биомассы (D(x)) и разложения органического вещества почвы (S(y, T(A))).

На этом заканчиваются уравнения, положенные в основу первого варианта объединенной модели. Однако существует физическое явление, которое присутствует всегда, — падение растворимости газа в жидкости при повышении температуры. Для учета величины вклада этого явления в глобальную динамику углерода добавлена переменная (*B*), описывающая количество углерода в поверхностном слове океана (18.4), во второй вариант объединенной модели добавлены зависящие от температуры (в конечном счете, от концентрации углекислого газа в атмосфере) коэффициенты $M_{in}(A) = e^{-0.03(T_0 - T(A))}$ и $M_{out}(A) = e^{-0.03(T(A) - T_0)}$, где T_0 и T(A) описаны выше. Эти коэффициенты получены путем простой эмпирической аппроксимации данных по концентрации CO₂ в воде при различной температуре [Кондратьев, Крапивин, 2004].

Теперь важно отметить, почему в модель не вошли остальные процессы, присутствующие в схеме на рис. 9. Проведенная модельная оценка вклада морской биоты в динамику сезонных колебаний [Degermendzhi et al., 2009] показала, что ее можно не учитывать. Это объясняется тем, что фитопланктон поглощает в год из атмосферы количество углерод, сравнимое с количеством, поглощаемым наземной биомассой, имея при этом более, чем в 100 раз, меньшую массу. Это приводит к очень быстрому обороту углерода через морскую биоту, что формально делает биомассу фитопланктона быстрой переменной модели, просто описывающей медленные сезонные изменения атмосферной концентрации CO₂.

Обмен углерода между слоями воды над термоклином и под термоклином достаточно инерционен, а поскольку нас интересуют самые быстрые процессы, то эти процессы также были исключены из рассмотрения.

Подстройка параметров модели осуществлялась на основе данных по динамике концентрации углекислого газа в прошлом, начиная с 1700 года по наше время и на основе данных по сжиганию ископаемых топлив с 1860 года (http://cdiac.esd.ornl.gov). Дополнительно были использованы данные по динамике атмосферной концентрации углекислого газа, полученные на обсерватории Мауна Лоа, и данные по изменению типов и методов землепользования [Houghton, 2003].

Результаты вычислительных экспериментов с интегрированной моделью приведены на рисунке 10. Можно видеть, что катастрофические режимы в пределах ближайшего столетия могут возникать уже при меньшей (на 2 °C) чувствительности климата. Это означает, что введенная положительная обратная связь (падение растворимости CO_2 с ростом температуры) оказывает ощутимое влияние на устойчивость системы «биосфера–климат».

Кроме того, нужно отметить, что наблюдаемое после катастрофы понижение температуры и возобновление роста биоты (рис. 10) во втором варианте модели не наблюдается, по крайней мере, на интервале до 500 лет. Это еще раз показывает, что свойство падения растворимости газов с ростом температуры ослабляет компенсационные свойства океана, причем существенно.

Различия между результатами, полученными на объединенной и базовой моделях, объясняются значительной компенсаторной ролью океана. Однако, как показывают результаты моделирования, океан не всегда способен удерживать систему «биосфера–климат» внутри благоприятного для человека диапазона.

Более того, учет физического явления — падения растворимости газов в жидкости при повышении температуры ослабляет компенсаторную функцию океана. В то же время нужно отметить, что объединенная модель дает более реалистичную и несколько более оптимистичную динамику поведения биосферы. Если сжигание топлива прекращается до даты необратимости, то основные параметры биосферы могут вернуться к значениям, близким к исходным.



Рис. 10. Варианты сценариев развития биосферы без учета (верхний ряд) и при учете (нижний ряд) растворимости СО2, и при различных значениях чувствительности климата T_{del}. Графики верхнего ряда соответствуют следующим значениям T_{del}: (a) 3 °C; (б) 6 °С; (в) 8 °С. В последнем случае дата необратимости — 2073 г. На графике сплошная линия описывает динамику биомассы, пунктирная — мертвого органического вещества. Графики нижнего ряда соответствуют следующим значениям T_{del}: (a) 2 °C; (б) 4,5 °С; (в) 6 °С. В последнем случае дата необратимости — 2073 г. На графике сплошная линия описывает динамику биомассы, пунктирная — мертвого органического вещества, штриховая — изменение температуры

Новая концепция климата. Климатические сдвиги

В отчетах межправительственной группы экспертов по изменению климата (МГЭИК) утверждается, что как минимум с середины ХХ века происходит глобальное потепление, вызванное нагревающим воздействием антропогенных парниковых газов, концентрация которых в атмосфере монотонно возрастает. Следовательно, парадигма МГЭИК заключается в том, что в ответ на антропогенное парниковое воздействие должен происходить непрерывный рост глобальной приповерхностной температуры. В то же время наблюдения показывают более сложную структуру временной динамики глобальной температуры наблюдаются постоянные короткие флуктуации температуры. Причина большинства этих флуктуаций известна — это явление Эль-Ниньо Южное Колебание (ENSO).

Различия характерных времен позволяют предположить, что долговременная динамика и кратковременные флуктуации глобальной температуры порождаются разными механизмами и могут рассматриваться и изучаться раздельно, по крайней мере, в первом приближении. Тогда для эффективного изучения особенностей долговременной динамики глобальной температуры, которая тесно связана с темой глобальных изменений климата, необходимо объективно разделять эти две вышеуказанные компоненты.

Идея подхода заключается в разложении пространственно-временных данных по поверхностной температуре (например, HadSST3) в виде суммы произведений пространственных эмпирических ортогональных функций ($EOF_i(uupo$ ma, doncoma)) и временных зависимостей так называемых главных компонент $PC_i(t)$:

$$HadSST3(lat, lon, t) = EOF_1(lat, lon) \cdot PC_1(t) + EOF_2(lat, lon) \cdot PC_2(t) + \dots + EOF_n(lat, lon) \cdot PC_n(t) + Ocmamo\kappa(lat, lon, t).$$

Оказалось, что первая эмпирическая ортогональная функция, представляющая собой карту воздействий, очень хорошо описывает именно эффект ENSO и первая главная компонента $PC_1(t)$ очень близка к различным индексам ENSO (Nino34(Kaplan), Nino34(HadSST1), MEI): *ENSO_Lin_Eff(lat, lon, t) =* $EOF_1(lat, lon) \cdot PC_1(t)$.

Поскольку первая компонента оказывает самое большое влияние на наблюдаемую динамику, то мы можем, движимые стремлением к максимально простому представлению глобальной динамики, получить первое приближение *WP*₁ в виде:

$$WP_1(lat, lon, t) = T(lat, lon, t) - ENSO_Lin_Eff(lat, lon, t).$$

Здесь ENSO_Lin представляет собой линейный без временной задержки вклад ENSO в изменения температуры. Главный результат такого представления состоит в том, что мы исключили из рассмотрения температурной динамики огромные кратковременные вариации температуры, вызванные эффектами El Nino и La Nino. В итоге в результате годичного усреднения глобальных температурных аномалий после вычитания ENSO и вклада вулканов было показано, что потепление в интервале 1950–2012 гг. происходило посредством двух скачков. Подобные скачки наблюдаются и для ряда других параметров [Барцев и др., 2016; Belolipetsky et al., 2015; Reid et al., 2016; Saltykov et al, 2017].

Для анализа обновленного временного ряда температур был использован тот же алгоритм [Rodionov, 2004], что в предыдущих работах этого направления. Данные брали с https://climexp.knmi.nl/. Было показано, как при выбранном уровне значимости 5 % глобальная температуры, очищенная от ENSO (рис. 11), испытала сдвиг температуры в 2012 году. Величина глобального сдвига незначительно превышает 0,2 градуса, а сдвиг в умеренных широтах немного меньше 0,4 градусов.



Рис. 11. Аномалии среднегодовой глобальной температуры океана и суши без вклада Южного колебания Эль-Ниньо (ENSO) и извержений вулканов. Величины сдвигов в порядке следования: 0,14; 0,26; 0,22 °C. Суммарный прирост по стабилизированным состояниям составляет 0,62 °C

Обнаружение очередного климатического сдвига ставит вопрос о типичности такого рода динамики, что побудило применить алгоритм поиска климатических сдвигов к менее надежным данным большей длительности (рис. 12).

Оказалось, что с начала XX века температура северного полушария претерпела семь климатических сдвигов, причем сдвиг 1964 года направлен в сторону понижения температуры. Интересно отметить, что этот сдвиг по величине



Рис. 12. Аномалии среднегодовой поверхностной температуры северного полушария (30–70° с.ш.) с начала XX века по наши дни. Величины сдвигов в порядке следования: 0,07; 0,21; 0,15; -0,15; 0,27; 0,46; 0,39 °C. Суммарный прирост по стабилизированным состояниям равен 1,40 °C, причем 80 % потепления произошло за последние 33 года — 28 % всего времени

в точности (в пределах точности вычислений) равен предшествующему повышающему сдвигу 1934 года и составляет 0,15 °С, что позволяет предположить существование дискретных устойчивых состояний СБК. Отсутствие подобного сдвига при последующем повышении температуры можно объяснить либо тем, что естественные вариации климата скрыли его, либо что он произошел непосредственно перед следующим и они слились в один. В любом случае, если принять гипотезу (несмотря на достаточное количество статистического материала, сдвиги смогут войти в теорию климата только после построения адекватных моделей) о чередовании длительных периодов устойчивости климата, разделенных внезапными сдвигами, то возникает вопрос о возможных, хотя бы концептуальных, механизмах множественных (в прямом смысле этого слова не два и три, а много) состояний СБК.

Феноменологическая модель климатических сдвигов

Наличие нескольких сдвигов ставит принципиальный вопрос о механизме этих сдвигов, поскольку широко рассматриваемые модели бистабильных систем [Jin, 1997; Cessi, 1994; Marotzke, 2000; Brovkin, 2002; Abbota, Tzipermana, 2008; DAndrea et al., 2006; Sessions et al., 2010] здесь непосредственно не могут быть использованы. Гипотеза о том, что множественные переключения на глобальном уровне могут объясняться вкладом климатических доменов, переключающихся между двумя стабильными состояниями [Барцев и др., 2016; Bartsev et al., 2017], предполагает, что на Земле должны присутствовать компактные области, где изменения температуры должны быть значительны. Таких климатических доменов обнаружить не удалось. Поэтому была предпринята попытка построить феноменологическую модель климатических сдвигов и очертить обцие свойства такого рода систем, для чего, обычно, и предназначены феноменологические модели.

Анализ литературы показывает запутанную картину разнообразных обратных связей, которые, в силу сложности СБК, еще слабо изучены. Рассмотрим, например, возможные последствия роста концентрации CO₂ помимо парникового эффекта. Так, транспирация растений зависит от концентрации CO₂, но чувствительность этого процесса в массе растений и при различных условиях не определена. Оценки показывают, что в зависимости от чувствительности к CO₂ земные осадки изменятся на от -10 до +27 % к 2100 году при сценарии с высокими выбросами [Mengis et al., 2015]. Вклад растений в формирование облачного покрова и конвекцию влаги в средней тропосфере может составлять до 21 и 56 % соответственно [Sikma, Vilà-Guerau de Arellano, 2019].

Растительность играет ключевую роль в атмосферном конвективном перемешивании, которое недавно было определено как источник половины дисперсии в прогнозах глобального потепления. Основная причина кроется в обратной связи, управляемой облаком, разделяющим входящий прямой и рассеянный свет. Это напрямую влияет на баланс поверхностной энергии, который впоследствии контролирует вышележащую атмосферу, что приводит к изменению скорости конвекции. Оказывается, что климат высокочувствителен к отклику растений на атмосферные условия [Jasechko, 2018]. Модели показывают [Kooperman et al., 2018], что с ростом CO₂ усиливается асимметрия осадков с относительным увеличением над тропическими лесами Азии и Африки и уменьшением над лесами Южной Америки. Эти изменения в осадках и конвекции связаны с изменениями облачного покрова. Показана [Abbota, Tzipermana, 2008] возможность возникновения положительной обратная связи, которая активируется по мере увеличения концентрации СО2 и приводит к высокими температурам пограничного слоя, конвекции в средних и высоких широтах. Возможно возникновение множественного равновесия и гистерезиса по отношению к СО₂.

В свою очередь, большие колебания запасов воды в почве и температуры поверхности на континентах связаны с положительной обратной связью между осадками и влажностью почвы [DAndrea et al., 2006]. Эта положительная обрат-

ная связь включает изменение потоков влаги, конвекцию, осадки и эвапотранспирацию. Этот механизм может генерировать бимодальное распределение влажности почвы, поскольку она связана с изменением эффективности выпадения осадков, зависящей от интенсивности конвекции.

Но и сама почва является очень сложной системой и может по-разному реагировать на потепление климата [Wang et al., 2019], демонстрируя иногда почти пороговую реакцию на повышение температуры. Более того, показано [Zhant et al., 2015], что скорость почвенного дыхания может демонстрировать петлю гистерезиса в ответ на изменения температуры почвы (T_s) и концентрации CO₂. Вегетационная продуктивность полузасушливых экосистем тоже может демонстрировать внезапные сдвиги [Ma et al., 2015].

Вносить сложность в прогноз биосферной динамики могут разные факторы, например, приземный тропосферный озон [Arnold et al., 2018]. Показано, что изменение концентрации озона вызывает глобальную транспирационную реакцию растений. В радиационном эффекте преобладает уменьшение коротковолнового воздействия облаков в загрязненных регионах в ответ на вызванное озоном уменьшение потока влаги между землей и атмосферой, приводящей к уменьшению атмосферной влажности.

Влияние повышения температуры может приводить к сочетанным воздействиям вследствие функционирования глобальной климатической системы. Отмечается [Coumou et al., 2018], что температура и осадки летом антикоррелированы практически повсюду на внетропических территориях. Таким событиям способствуют положительные термодинамические обратные связи, которые способствуют истощению влажности почвы и усилению ощутимого нагрева поверхности по мере того, как земля нагревается, но они также сильно регулируются атмосферной динамикой, которая инициирует и поддерживает аномальное нагревание и высыхание.

Все эти примеры были приведены, чтобы проиллюстрировать практически необъятную сложность системы взаимодействий в СБК. Принципиально важным является наличие нескольких, т. е. более чем двух стабильных состояний, что означает, что мы имеем дело с очень сложной нелинейностью, являющейся результатом сложного взаимодействия разных подсистем СБК, некоторые из которых были приведены в предваряющем обзоре. Представляется, что в этой ситуации имеет смысл обратиться к феноменологической модели, которая, с одной стороны воспроизводит наблюдаемую динамику, а с другой стороны позволяет сопоставить некоторые общие условия, которые эту динамику обеспечивают.

Феноменологическая модель строится с использованием ранее опубликованной идеи коллектива [Барцев и др., 2016]. За основу взято уравнение, описывающее динамику температурной аномалии. Из этого уравнения исключены члены, описывающие метановый форсинг и влияние аэрозолей, и добавлено слагаемое, описывающее модуляцию форсинга под действием всей совокупности возможных причин, некоторые из которых были упомянуты выше:

$$C\frac{d(\Delta T)}{dt} = r(A) - f_B \cdot \Delta T - r_{\rm mod}(\Delta T).$$
⁽¹⁹⁾

Возможный вид функции, описывающей модуляцию форсинга, которая может обеспечить множественные устойчивые стационарные состояния, приведен на рис. 13.



Температура, град.

Рис. 13. Иллюстрация формирования мультистабильных состояний. Комментарии в тексте

Разность красного и синего графиков определяет знак производной $d(\Delta T)/dt$ и направление движения системы. Так, на рисунке номерами 1 и 2 обозначены устойчивое и неустойчивое стационарные состояние соответственно. Функция модуляции форсинга представлена здесь феноменологически, как функция одного аргумента, что, конечно же, не так. Можно представить, что эта функция есть результат проекции функции многих переменных, которая, в принципе, может реализоваться, если остальные переменные имеют меньшие характерные времена, чем характерное время температурных изменений.

Формирование температурных сдвигов в модели иллюстрирует рисунок 14. Повышение концентрации CO₂ приводит к увеличению форсинга r(A), что соответствует смещению прямой линии вверх, при этом стационарная точка тоже смещается вверх (рис. 14, *a*). При достижении верхней точки происходит быстрый перескок на склон следующей вершины, что соответствует скачку температуры (рис. 14, δ). При дальнейшем повышении концентрации CO₂ процесс повторяется (рис. 14, *в*). Если происходит уменьшение температуры, вследствие

ослабления форсинга (см. рис. 13), то произойдет скачок в сторону уменьшения температуры (рис. 14, *в*), причем при подобии нижнего рельефа верхнему обратный скачок по величине будет близок к прямому (см. рис. 13).



Рис. 14. Иллюстрация механизма формирования скачков или сдвигов температуры. Комментарии в тексте

Модель для вычислительных экспериментов включает также простое уравнение, описывающее эмиссию парниковых газов, причем данные до настоящего времени — это оценки реальных выбросов, которые продолжаются в будущее в соответствии с наиболее вероятным сценарием сжигания ископаемых топлив:

$$\begin{cases} \frac{dA}{dt} = Emission \ (t), \\ C \frac{d(\Delta T)}{dt} = r(A) - f_B \cdot \Delta T - r_{\text{mod}} (\Delta T). \end{cases}$$
(20)

Результаты вычислительного моделирования представлены на рисунке 15. Феноменологическая модель показала, что ни при каких значениях параметров невозможно убрать медленное возрастание температуры между сдвигами, которое для некоторых интервалов не очень заметно, но присутствует всегда. Возникшее расхождение можно объяснить тремя способами: (1) статистическая модель, предполагающая строго горизонтальные участки между сдвигами, не совсем соответствует реальности, и нужно модифицировать статистическую модель и алгоритм детектирования сдвигов; (2) полимодальная функция представляет собой не чередование относительно плавных холмов, а напоминает собой пилу, причем угол наклона левых склонов выступов близок к 90 градусам; (3) механизм формирования сдвигов вообще не имеет ничего общего с предложенной феноменологической моделью. Для выбора варианта требуются дальнейшие исследования.



Рис. 15. Модельная динамика (синие линии) в сопоставлении с кривой выбросов углекислого газа (красная линия, верхний график) и между модельной динамикой и данными по динамике глобальной среднегодовой температуры

Кроме того, модель показала, что температурная инерционность модели должна быть существенно меньше, чем существующие оценки для тепловой инерционности земного шара. Это означает, что либо только поверхностные слои планеты участвуют в обнаруженных сдвигах, либо, опять же, модель не имеет ничего общего с реальностью. Ответ на этот вопрос тоже требует дальнейших исследований.

Заключение

Как можно видеть из приведенных примеров, экологическая биофизика имеет общую методологическую базу с биофизикой, т. е. преимущественно использует предельно идеализированные описания, на основе которых строятся максимально простые, концептуальные модели. Но сами объекты исследования — экосистемы и биосфера в целом обладают рядом свойств, которые резко усложняют их исследование.

К этим свойствам нужно отнести принципиальную уникальность каждой экосистемы и невозможность проведения с ними «острых» экспериментов; «индивидуализм» каждого компонента экосистемы, который, например, в отличие от согласованной работы клеток многоклеточного организма, «тянет одеяло на себя», что приводит к почти постоянной конкуренции и сложным эволюционным путям; существенную нелинейность самих компонентов и связей между ними, порождающую сложную динамику; и, наконец, принципиальная зависимость от небиологических условий внешней среды, т. е. погоды и климата, которые сами проявляют сложную динамику и в то же время демонстрируют зависимость от глобального и локального состояний биосферы.

Все это приводит к тому, что мы вынуждены при изучении экосистем и биосферы применять различные концептуальные модели, отражающие какое-то одно свойство объекта или небольшое их число. Для получения общезначимых экологических результатов обязательно нужно прописывать условия подобия, формализующие сходство между уникальными экосистемами. Разработка технологии подобизации экологических систем позволила бы дополнить арсенал экологии настоящим экспериментом, осуществляемым на искусственных экосистемах. Поскольку взаимодействие между всеми организмами в принципе возможно только на основе единой биохимической базы, то простраивание сквозных связей между биохимией и физиологией организмов и их экологической ролью, выражаемое, в частности, и через стехиометрические ограничения, представляется необходимым для максимально адекватного описания экосистем.

Этот далеко не полный перечень задач и направлений дает, тем не менее, представление о богатстве перспектив дальнейшего развития экологической биофизики.

Литература

- Адамович В. В., Дегерменджи А. Г. Статистические закономерности организации маловидовых стационарных сообществ микроорганизмов // Ж. общей биологии. — 1985. — Т. XLVI, № 4. — С. 527–532.
- Адамович В. А., Терсков И. А., Дегерменджи А. Г. Эффект аутостабилизации контролирующих рост факторов и взаимодействия в сообществе // Доклады АН СССР. — 1987. — Т. 235, № 5. — С. 1236–1239.

- Барцев С. И., Барцева О. Д. Симметрии структуры и эквифинальность эволюционных исходов в простых нейросетевых моделях // Доклады РАН. 2002. Т. 386, № 1. С. 114–117.
- Барцев С. И., Барцева О. Д. Функционально-инвариантный подход к проблеме уникальности биологических систем: простая нейросетевая модель // Доклады РАН. 2005. Т. 405, № 4. С. 1–4.
- Барцев С. И., Барцева О. Д. Эвристические нейросетевые модели в биофизике: приложение к проблеме структурно-функционального соответствия. — Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, 2010. — 115 с.
- Барцев С. И., Дегерменджи А. Г., Ерохин Д. В. Глобальная минимальная модель многолетней динамики углерода в биосфере // ДАН. — 2005. — Т. 401, № 2. — С. 233– 237.
- Барцев С. И., Белолипецкий П. В., Дегерменджи А. Г., Иванова Ю. Д., Почекутов А. А., Салтыков М. Ю. Новый взгляд на динамику климата Земли // Вестник РАН. 2016. Т. 86, № 3. С. 244–251.
- Барцев С. И., Дегерменджи А. Г., Федотов А. М., Медведев С. Б., Пестунов А. И., Пестунов И. А. Биосферный триггер в минимальной модели углеродного цикла // Доклады РАН. 2012. Т. 443, № 4. С. 500–503.
- Бернал Дж. Д. Молекулярная структура, биохимическая функция и эволюция // Теоретическая и математическая биология. — М.: Мир, 1968. — С. 110–151.
- Блюменфельд Л. А. Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики. М.: Едиториал УРСС, 2002. 160 с.
- Вернадский В. И. Биосфера и ноосфера. М.: Айрис-пресс, 2012. 576 с.
- Волькенштейн М. В. Общая биофизика. М.: Наука, 1978. 590 с.
- Гаузе Г. Ф. Математический подход к проблемам борьбы за существование // Зоол. журн. — 1933. — Т. 12. — С. 170–177.
- Дегерменджи А. Г., Абакумов А. И. Принцип конкурентного исключения в двухвидовом сообществе с одним метаболическим фактором регуляции // Доклады Академии наук. Серия «Биохимия, биофизика, молекулярная биология». — 2018. — Т. 480, № 4. — С. 495–498.
- Дегерменджи А. Г., Печуркин Н. С., Шкидченко А. Н. Аутостабилизация факторов, контролирующих рост в биологических системах. Новосибирск: Наука, 1979. 141 с.
- Иваницкий Г. Р., Кринский В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки. М.: Наука, 1978. 308 с.
- Кондратьев К. Я., Крапивин В. Ф. Моделирование глобального круговорота углерода. — М.: Физматлит, 2004. — 336 с.
- Лернер Я. А. Начала кибернетики. М.: «Наука», 1967. 400 с.
- Митчерлих Э. А. Почвоведение / Пер. с нем. Э. Н. Шконде / Под ред. Ф. В. Турчина. М.: ИЛ, 1957. 417 с.
- Моровиц Г. Исторический очерк // Теоретическая и математическая биология. М.: Мир, 1968. С. 34–48.
- Салтыков М. Ю., Барцев С. И., Ланкин Ю. П. Зависимость устойчивости моделей замкнутых экосистем от числа видов // Журнал СФУ. Сер. «Биология 2». — 2011. — № 4. — С. 197–208.
- Свирежев Ю. М. Нелинейные волны, диссипативные структуры и катастрофы в экологии. М.: Наука, 1987. 386 с.
- Свирежев Ю. М. Устойчивость биологических сообществ / Ю. М. Свирежев, Д. О. Логофет. М.: Наука, 1978. 352 с.
- Семёнов С. М. Парниковые газы и современный климат земли. М.: ИЦ «Метеорология», 2004. 176 с.
- Хорн Р. Матричный анализ / Р. Хорн, Ч. Джонсон. М.: Мир, 1989. 655 с.
- Фон Нейман Дж. Теория самовоспроизводящихся автоматов / Дж. Фон Нейман; закончено и отредактировано А. Бёрксом. М.: Мир, 1971. С. 382.
- Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. М.: Мир, 1973. 216 с.
- Abbota D. S., Tzipermana E. A high-latitude convective cloud feedback and equable climates // Q. J. R. Meteorol. Soc. — 2008. — Vol. 134. — P. 165–185.
- Arnold S. R. et al. Simulated global climate response to tropospheric ozone-induced changes in plant transpiration // Geophys. Res. Lett. 2018. Vol. 45. P. 13070–13079.
- Barlow C., Volk T. Open systems living in a closed biosphere: a new paradox for the Gaia debate // BioSystems. — 1990. — Vol. 23 (4). — P. 371–384.
- Bartsev S. I. Stoichiometric constraints and complete closure of long-term life support systems / Adv. in Space Res. 2004. V. 34. P. 509–1516.
- Bartsev S., Belolipetskii P., Degermendzhi A. Multistable states in the biosphere-climate system: towards conceptual models // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. — 2017. — Vol. 173. — 012005.
- Bartsev S. I., Degermendzhi A. G., Erokhin D. V. Principle of the worst scenario in the modelling past and future of biosphere dynamics // Ecological Modelling. — 2008. — Vol. 216 (2). — P. 160–171.
- Bartsev S. I., Degermendzhi A. G., Sarangova A. B. Stability of the Biosphere and Sustainable Development: a Challenge to Biospherics // Journal of Siberian Federal University. Biology. — 2017. — Vol. 10 (2). — P. 134–152.
- Bartsev S. I., Degermendzhi A. G., Sarangova A. B. Closure of Earth's Biosphere: Evolution and Current State // Journal of Siberian Federal University. Biology. — 2019. — Vol. 12 (3). — P. 337–347.
- Belolipetsky P., Bartsev S., Ivanova Y., Saltykov M. Hidden Staircase Signal in Recent Climate Dynamic // Asia-Pac. J. Atmos. Sci. — 2015. — Vol. 51 (4). — P. 323–330.
- Brovkin V. Climate-vegetation interaction // J. Phys. IV France. 2002. Vol. 12. P. 52–57.
- Brovkin V., Sitch S., Bloh von W., Claussen M., Bauer E., Cramer W. Role of land cover changes for atmospheric CO₂ increase and climate change during the last 150 years // Glob. Change Biol. 2004. Vol. 10. P. 1253–1266.

- Cessi P. A simple box model of stochastically forced thermohaline flow // Journal of Physical Oceanography. 1994. Vol. 24. P. 1911–1920.
- Coumou D. et al. The influence of Arctic amplification on mid-latitude summer circulation // Nat. Commun. 2018. Vol. 9. P. 2959.
- DAndrea F., Provenzale A., Vautard R., De Noblet-Decoudre N. Hot and cool summers: Multiple equilibria of the continental water cycle // Geophysical Research Letters. — 2006. — Vol. 33. — P. L24807.
- Degermendzhi A. G. New directions in biophysical ecology // Global Climatology and Ecodynamics: Anthropogenic Changes to Planet Earth. — Springer Praxis Books / Environmental Sciences, 2009. — P. 379–396.
- Degermendzhi A. G., Bartsev S. I., Gubanov V. G., Erokhin D. V., Shevirnogov A. P. Forecast of biosphere dynamics using small-scale models // Global Climatology and Ecodynamics: Anthropogenic Changes to Planet Earth / Ed. A. P. Chacknell, V. F. Krapivin, C. A. Varotsos. — Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd., 2009. — P. 241– 300.
- Drijfhout S. et al. Catalogue of abrupt shifts in Intergovernmental Panel on Climate Change climate models // PNAS. 2015. Vol. 112 (43). P. E5777–E5786.
- Fitter A. H., Self G. K., Brown T. K., Bogie D. S., Graves J. D., Benham D., Ineson P. Root production and turnover in an upland grassland subjected to artificial soil warming respond to radiation flux and nutrients, not temperature // Oecologia. — 1999. — Vol. 120. — P. 575–581.
- Gifford R. M. Implications of CO₂ effects on vegetation for the global carbon budget // The global carbon cycle / M. Heimann (ed.). Berlin: Springer-Verlag, 1993. P. 159–199.
- Houghton R. A. Revised estimates of the annual net flux of carbon to the atmosphere from changes in land use and land management 1850–2000 // Tellus. 2003. Vol. 55B. P. 378–390.
- Hutchinson G. E. The paradox of the plankton // The American Naturalist. 1961. Vol. 95 (882). P. 137–145.
- IPCC. Climate Change. 2001: Scientific aspects. UNEP, 2001. 881 p. www.ipcc.ch
- IPCC Report 2007. Climatic Change 2007: The Physical Basis / S. Solomon, D. Qin, M. Manning et al. (eds.) N. Y.: Cambridge University Press, 2007.
- Ives A. R., Carpenter S. R. Stability and diversity of ecosystems // Science. 2007. Vol. 317. — P. 58–62.
- Jasechko S. Plants turn on the tap // Nature Clim. Change. 2018. Vol. 8. P. 562–563.
- Jin F.-F. An Equatorial Ocean Recharge Paradigm for ENSO. Part I: Conceptual Model // Journal of the Atmospheric Sciences. 1997. Vol. 54. P. 811–829.
- Judson O. P. The energy expansions of evolution // Nature Ecology & Evolution. 2017. Vol. 1 (6). UNSP 0138.
- Johnson L. C., Shaver G. R., Cades D. H., Rastetter E., Nadelhoffer K., Giblin A., Laundre J. Stanley A. Plant carbon-nutrient interactions control CO₂ exchange in Alaskan wet sedge tundra ecosystems // Ecology. — 2000. — Vol. 81. — P. 453–469.

- Keeling C. D., Whorf T. P. and the Carbon Dioxide Research Group, Scripps Institution of Oceanography (SIO). Univ. of California, La Jolla, California USA, 2001. August 13. http://cdiac.ornl.gov/trends/co2/sio-mlo.htm
- Kooperman G. J. et al. Forest response to rising CO₂ drives zonally asymmetric rainfall change over tropical land // Nature Clim. Change. 2018. Vol. 8. P. 434–440.
- Lenton T. M. et al. Climate tipping points Too risky to bet against // Nature. 2019. Vol. 575. P. 592–595.
- Levine J. M., HilleRisLambers J. The importance of niches for the maintenance of species diversity // Nature. — 2009. — Vol. 461. — P. 254–257.
- Liski J., Ilvesniemi H., Makela A., Westman C. J. CO₂ emissions from soil in response to climatic warming are overestimated — The decomposition of old soil organic matter is tolerant of temperature // Ambio. — 1999. — Vol. 28. — P. 171–174.
- Lucarini V., Bódai T. Edge states in the climate system: exploring global instabilities and critical transitions // Nonlinearity. — 2017. — Vol. 30. — P. R32–R66.
- Lyons T. W., Reinhard C. T., Planavsky N. J. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere // Nature. 2014. Vol. 506 (7488). P. 307–315.
- Ma X., Huete A., Moran S., Ponce-Campos G., Eamus D. Abrupt shifts in phenology and vegetation productivity under climate extremes // J. Geophys. Res. Biogeosci. — 2015. — Vol. 120. — P. 2036–2052.
- Marcott S. A., Shakun J. D., Clark P. U., Mix A. C. A Reconstruction of Regional and Global Temperature for the Past 11 300 Years // Science. — 2013. — Vol. 339. — P. 1198– 1201.
- Marotzke J. Abrupt climate change and thermohaline circulation: Mechanisms and predictability // PNAS. — 2000. — Vol. 97 (4). — P. 1347–1350.
- May R. M. Stability in multi-species community models // Math. Biosciences. 1971. Vol. 12. P. 59–79.
- Mengis N. et al. Uncertainty in the response of transpiration to CO₂ and implications for climate change // Environ. Res. Lett. — 2015. — Vol. 10. — P. 094001.
- Morgan J. A., LeCain D. R., Mosier A. R., Milchunas D. G. Elevated CO₂ enhances water relations and productivity and affects gas exchange in C3 and C4 grasses of the Colorado shortgrass steppe // Global Change Biol. 2001. Vol. 7. P. 451–466.
- Neukom R., Steiger N., Gómez-Navarro J. J., Wang J., Werner J. P. No evidence for globally coherent warm and cold periods over the preindustrial Common Era // Nature. — 2019. — Vol. 571. — P. 550–572.
- Pelletier J. D. Are large complex ecosystems more unstable? A theoretical reassessment with predator switching // Math. Biosciences. 2000. Vol. 163. P. 91–96.
- Piao S., Ciais P., Friedlingstein P. et al. Net carbon dioxide losses of northern ecosystems in response to autumn warming // Nature. — 2008. — Vol. 451. — P. 49–52.
- Polis G. A. Complex trophic interactions in deserts: an empirical critique of food web theory // The American Naturalist. 1991. Vol. 138. P. 123–155.

- Pritchard S. G., Davis M. A., Mitchell R. J., Prior A. S., Boykin D. L., Rogers H. H., Runion G. B. Root dynamics in an artificially constructed regenerating longleaf pine ecosystem are affected by atmospheric CO₂ enrichment // Environmental and Experimental Botany. — 2001. — Vol. 46. — P. 35–69.
- Reid P. C., Hari R. E., Beaugrand G., Livingstone D. M., Marty C., Straile D., et al. Global impacts of the 1980s regime shift // Global Change Biology. — 2016. — Vol. 22. — P. 682–703.
- Risk D., Kellman L., Beltrami H. Carbon dioxide in soil profiles: Production and temperature dependence // Geophysical Research Letters. 2002. Vol. 29, No. 6. P. 111–114.
- Rodionov S. N. A sequential algorithm for testing climate regime shifts // Geophysical Research Letters. — 2004. — Vol. 31. — P. L09204.
- Rochette P., Angers D. A., Flanagan L. B. Maize Residue Decomposition Measurement Using Soil Surface Carbon Dioxide Fluxes and Natural Abundance of Carbon-13 // Soil Science Society of America Journal. — 1999. — Vol. 63. — P. 1385–1396.
- Saltykov M. Yu., Bartsev S. I. Developing of discrimination experiment to find most adequate model of plant's multi-nutrient functional response // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, 2017. — Vol. 173. — 012017. — DOI: 10.1088/1757-899X/173/1/012017.
- Saltykov M. Yu., Bartsev S. I., Lankin Yu. P. Stability of closed ecology life support systems (CELSS) models as dependent upon the properties of methabolism of the described species // Adv. Space Res. — 2012. — Vol. 49, No. 2. — P. 223–229.
- Sessions S. L., Sugaya S., Raymond D. J., Sobel A. H. Multiple equilibria in a cloud resolving model using the weak temperature gradient approximation // Journal of Geophysical Research. — 2010. — Vol. 115. — P. D12110.
- Sikma M., Vilà-Guerau de Arellano J. Substantial reductions in cloud cover and moisture transport by dynamic plant responses // Geophysical Research Letters. — 2019. — Vol. 46. — P. 1870–1878.
- Steffen W. et al. Trajectories of the Earth System in the Anthropocene // PNAS. 2018. Vol. 115 (33). P. 8252–8259.
- Stainforth D. A., Aina T., Christensen C. et al. Uncertainty in predictions of the climate response to rising levels of greenhouse gases // Nature. — 2005. — Vol. 433. — P. 403– 406.
- Turing A. M. The chemical basis of morphogenesis / A. M. Turing // Phil. Trans. Roy. Soc. of London, Ser. B. — 1952. — Vol. 237. — P. 37–72.
- Wang G., Li F., Peng Y. et al. Responses of soil respiration to experimental warming in an alpine steppe on the Tibetan Plateau // Environ. Res. Lett. 2019. Vol. 14. 10 p.
- Winemiller K. O. Spatial and temporal variation in tropical fish trophic networks // Ecol. Monogr. — 1990. — Vol. 60. — P. 331–367.
- Zhang Q., Katul G. G., Oren R., Daly E., Manzoni S., and Yang D. The hysteresis response of soil CO₂ concentration and soil respiration to soil temperature // J. Geophys. Res. Biogeosci. — 2015. — V. 120(8). — P. 1605–1618.

Ecological biophysics — horizons of development

S. I. Bartsev^{1,2}, A. G. Degermendzy¹, A. B. Sarangova², N. N. Degermendzy³

¹Institute of Biophysics SB RAS, FRC KSC SB RAS ²Siberian Federal University ³Krasnoyarsk State Medical University E-mail: nn1947@yandex.ru

Ecological biophysics has a common methodological base with biophysics, which mainly uses extremely idealized descriptions, on the basis of which the most simple, conceptual models are built. At the same time, the separation of ecological biophysics into a separate section of the biophysics of complex systems is due to the specifics of the object under study — ecosystems and the biosphere as a whole have a number of properties that greatly complicate their study.

These properties include:

- the fundamental uniqueness of each ecosystem and the impossibility of conducting "sharp" experiments with them related to assessing the limits of ecosystem stability;
- "individualism" of each component of an ecosystem, which, for example, in contrast to the coordinated work of the cells of a multicellular organism, "pulls the blanket over itself", which leads to almost constant competition and complex evolutionary development paths;
- significant non-linearity of the components themselves and the interactions between them, generating difficult-to-predict dynamics;
- fundamental dependence on non-biological environmental conditions, i.e. weather and climate, which themselves exhibit complex dynamics and, at the same time, demonstrate dependence on the global and local state of the biosphere.

All this leads to the fact that when studying ecosystems and the biosphere, we are forced to apply various conceptual models that reflect one property of an object or a small number of them. To obtain generally significant ecological results, it is necessary to prescribe similarity rules that formalize the similarity between unique ecosystems. The development of a technology for similarization of ecological systems would make it possible to supplement the arsenal of ecology with a real experiment carried out on artificial ecosystems. Since the interaction between all organisms is, in principle, possible only on the basis of a single biochemical base, then building through links between the biochemistry and physiology of organisms and their ecological role, expressed in particular and through stoichiometric constrains, seems necessary for the most adequate description of ecosystems.

This far from complete list of problems and directions nevertheless gives an idea of the wealth of prospects for the further development of ecological biophysics.

Keywords: ecological biophysics, mathematical modeling, biosphere, experimental ecological systems, reproducibility of ecological experiments, ecological similarity, flexible metabolism models, Vernadsky–Darwin paradox, worst-case scenario principle, climate shift model.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ РЕГИСТРАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ И БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Д. Н. Маторин¹

В главе изложены научно-методологические подходы к использованию параметров быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла для биотестирования загрязнений. Приведены конкретные примеры использования этих методов при изучении влияния различных экотоксикантов и наноматериалов.

Ключевые слова: микроводоросли, фотосинтез, длительное послесвечение, замедленная флуоресценция, флуоресценция хлорофилла, биотестирование.

Функционирование фотосинтезирующих организмов определяет существование почти всех экологических систем на Земле. В настоящее время в связи с климатическими проблемами и увеличением вредных выбросов чрезвычайно актуальным является разработка чувствительных методов мониторинга. Биотестирование как метод водной токсикологии обычно используют для регламентирования токсического загрязнения водной среды или выработки норм допустимых нагрузок на водные экосистемы [Руководство Минприроды, 2002]. Для решения задач мониторинга водной среды необходимы методы, позволяющие проводить диагностику на ранних стадиях антропогенных воздействий до появления видимых нарушений экосистемы [Филенко, 1988; Жмур, Орлова, 2007; Терехова и др., 2014; Котелевцев и др., 2015; Заядан и др., 2020; Perminova et al., 2001]. Определение содержания химических компонентов в окружающей среде не всегда возможно, так как, во-первых, часто не известен даже класс химических соединений, которые нужно контролировать, а во-вторых, действующие концентрации некоторых ксенобиотиков столь малы, что для химико-аналитического контроля не всегда могут быть определены. Многие биологически активные вещества, кроме этого, нестабильны и после взаимодействия с биологической мишенью в короткие сроки распадаются [Филенко, 1988]. Эти условия объясняют возрастающий в настоящее время интерес к изучению отклика экосистем и отдельных биологических объектов на антропогенные воздействия. Подобные исследования проводятся на основе биотестирования и биоиндикации.

Микроводоросли (фитопланктон) — базовое звено биоценозов, которое определяет состояние и продуктивность водных экосистем [Falkowski, Raven, 1997]. При действии антропогенных загрязнений изменяется фотосинтетическая

¹ Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12. E-mail: dnmatorin@mail.ru

активность клеток фитопланктона [Маторин, Рубин, 2012]. Регистрация фотосинтетической активности микроводорослей позволяет определить состояние основных первичных продуцентов пищевой цепи и поэтому является чувствительнейшим сенсором, характеризующим здоровье водной экосистемы.

В настоящее время достигнуты большие успехи в использовании флуоресцентных методов для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата растений и водорослей [Маторин, Рубин, 2012; Гольцев и др., 2014; Маторин, Яковлева, 2019; Baker, 2008; Schreiber et al., 2004; Allakhverdiev, 2011; Kalaji et al., 2014, 2016]. Эти методы обладают высокой чувствительностью, производительностью, точностью и позволяют проводить измерения *in situ* в режиме реального времени, что очень важно для решения экологических проблем [Маторин, Рубин, 2012; Joshi, Mohanty, 2004; Mohammed et al., 1995; Mosharova et al., 2015; Shchegolkova et al., 2018]. Основа флуоресцентных методов состоит в том, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит природным индикатором состояния клеток растений. При нарушении состояния клеток под воздействием неблагоприятных условий или токсикантов происходят изменения флуоресценции хлорофилла, которые и служат источником информации [Schreiber et al., 2004; Маторин, Рубин, 2012; Гольцев и др., 2014; Strasser et al., 2004, 2010].

Развитие этого подхода связано, с одной стороны, с соверщенствованием элементной базы и миниатюризации приборов и, с другой стороны, установлением механизмов связи изменений флуоресценции с реакциями фотосинтеза. Реализация этого подхода позволит определить комплекс параметров флуоресценции, отражающих здоровье клеток растений и водорослей, и составить «паспорт фотосинтеза» для быстрой оценки состояния клеток во внешних условиях.

В главе рассмотрены результаты исследований ученых кафедры биофизики МГУ по использованию флуоресцентных методик для оценки фотосинтетической активности водорослей при биомониторинге и биотестировании. Приведен пример применения погружного флуориметра для работы с природным фитопланктоном.

Природа быстрой, замедленной флуоресценции и термолюминесценции хлорофилла в фотосинтетических мембранах микроводорослей

Флуоресценция хлорофилла высших зеленых растений и водорослей пропорциональна количеству пигментов, поглощающих свет. Этот эффект давно используется в гидробиологии и океанологии для оценки обилия микроводорослей [Falkowski, Raven, 1997; Fadeev et al., 1999]. Однако в отличие от флуоресценции растворов пигментов в живых системах наблюдается так называемая переменная флуресценции, которая отражает днамику работы фотосинтетического аппарата и, соответственно, несет информацию об его активности.

Для анализа изменений в фотосинтезе у водорослей при действии факторов среды в настоящее время активно разрабатываются методы анализа индукции флуоресценции и регистрации световых зависимостей параметров флуоресценции при различном импульсном возбуждении (РАМ-флуориметрия). Важнейшими характеристиками первичных световых реакций фотосинтеза являются эффективность фотохимического преобразования энергии в фотосистеме 2 (ФС2) (в дальнейшем — фотохимическая активность ФС2), а также коэффициенты фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции, которые оценивают методом PAM (pulse-amplitude-modulation) [Schreiber et al., 2004; Корнеев, 2002]. При работе с листьями и культурами водорослей активно развиваются методы быстрого измерения световых зависимостей (световых кривых) различных параметров флуоресценции, отражающих развитие фотохимического и нефотохимического тушения на свету, что позволяет регистрировать ранние изменения в работе фотосинтетического транспорта электронов [Serodio et al., 2005; Ralph, Gademann, 2005; Herlory et al., 2007; Il'yash et al., 2013; Protopopov et al., 2015; Mosharov et al., 2019; Matorin et al., 2019].

Измерения быстрых световых зависимостей параметров флуоресценции на свету проводится при последовательном увеличении интенсивности. Время освещения можно изменять, но обычно оно составляет 50 с. В работе [Serodio et al., 2005] показано, что за этот период проходят быстрые адаптационные изменения в фотосинтезе водорослей при увеличении интенсивности света. В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности насыщающей вспышки (0,8 с, 3000 мкЕм⁻²c⁻¹) регистрируют квантовый выход флуоресценции (*Y*) на свету [Schreiber, 2004]. Квантовый выход на свету *Y* с учетом количества поглощенных квантов позволяет оценить скорость нециклического электронного транспорта. На основании полученной световой кривой скорости нециклического электронного транспорта (ETR) возможно расчитать следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона α кривой *P*/*E*), максимальную относительную скорость электронов по электрон-транспортной цепи (*ETR*_{max}) и насыщающую интенсивность света (*E*_н).

Наряду с этим развивается подход, связанный с анализом быстрой кинетики индукции флуоресценции, характеризующий электронный транспорт внутри ФС2 и между ФС2 и ФС1 [Strasser et al., 2004, 2010; Stirbet, Govindjee, 2011]. Вначале освещения темноадаптированного образца культуры водорослей можно наблюдать характерную индукционную кривую изменения интенсивности флуоресценции, в которой различают несколько фаз [Маторин и др., 2012; Strasser et al., 2004, 2010; Lazar, 2006; Antal et al., 2011]. Кинетики световой индукции переменной флуоресценции (ОЛР), измеренные *in vivo* в миллисекундном диапазоне при освещении насыщающим светом, характеризуются тремя восходящими фазами: ОЈ, Л и IP, отражающими, в основном, кинетику перехода центров Φ C2 из открытого состояния с окисленным Q_A в закрытое состояние с восстановленными акцепторами и последующей фазой снижения флуоресценции. Измерение индукционных кривых флуоресценции с высоким разрешением занимает всего несколько секунд и проводится на приборах типа РАМ и РЕА.

Для проведения количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров кинетической кривой O-J-I-P был предложен так называемый «JIP-тест» [Strasser et al., 2004]. JIP-тест оперирует следующими параметрами кинетической кривой индукции флуоресценции: (1) интенсивностью флуоресценции при 50 (20) мкс, 100 мкс и 300 мкс, 2 мс, 30 мс и 6 с; (2) временем достижения максимальной флуоресценции ($t_{\rm Fm}$) и (3) площадью над кинетической кривой до уровня F_m . Эти параметры используются для расчета характеристик первичных процессов фотосинтеза. Успехи, достигнутые в этом направлении, а также теоретические модели описаны в работах [Lazar, 2006; Strasser et al., 2004, 2010; Antal et al., 2009, 2011; Stirbet, Govindjee, 2011].

При анализе индукционных кривых возможно оценить энергетические потоки при фотосинтезе и рассчитать некоторые параметры: F_{ν}/F_m — максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФС2; V_J и V_I — относительная переменная флуоресценция в О-J- и J-I-фазах; φ_{Eo} — квантовая эффективность переноса электрона от Q_A^- ; φ_{Do} — квантовая эффективность рассеивания энергии; *ABS/RC* — поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром, характеризует относительный размер антенны; PI_{ABS} — индекс производительности — показатель функциональной активности ФС2, отнесенный к поглощаемой энергии; q_E параметр, характеризующий способность к рН-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции.

Другим важным источником информации о функционировании фотосинтетического аппарата при действии токсикантов является явление замедленной флуоресценции (3Φ) или длительного послесвечения, обнаруженный Арноном и Стреллером в 1951 г. [Strehler, Arnold, 1951]. После светового возбуждения фотосинтезирующие клетки способны испускать слабое длительно затухающее красное свечение продолжительностью до нескольких минут. Это свечение возникает в ходе темновых реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в реакционном центре Φ C2, связанных с разложением H₂O и выделением O₂. В процессе быстрой флуоресценции излучается 2–3 % поглощенной энергии, тогда как выход 3 Φ составляет только 0,03 % и менее от испускаемой флуоресценции.

Природа и свойства разных компонент рассмотрены в многочисленных обзорах [Маторин и др., 1985, 2011; Lavorel, 1975; Malkin, 1977; Amesz, Gorkom, 1978; Govindjee, Jursinic, 1979; Radenovic et al., 1994; Goltsev et al., 2009; Berden-Zrimec et al., 2011]. Интенсивность 3Ф зависит от состояния центров ФС2 и функционирования электрон-транспортной цепи фотосинтеза [Маторин и др., 2011; Гольцев и др., 2014]. Участие переносчиков в генерации компонент ЗФ с разным временем жизни представлено на рис. 1. Важной особенностью ЗФ является то, что при возбуждении последовательностью коротких вспышек света по ЗФ возможно следить за работой кислородовыделяющей системы хлоропластов и ее S-состояний [Goltsev et al., 1980, 2009]. Кроме этого, изучение 3Ф позволяет получить уникальную информацию об электрохимическом протонном градиенте на мембране тилакоида в целой клетке. Поскольку рекомбинация зарядов в реакционном центре происходит трансмембранно, интенсивность ЗФ чувствительна к энергизации мембран хлоропластов. Неблагоприятные факторы и загрязнение, влияющие на состояние мембран и вызывающие, соответственно, ингибирование процесса образования электрохимического градиента на мембране, подавляют выход 3Ф. Скорость увеличения интенсивности 3Ф при включении возбуждающего света на индукционных кривых отражает нарастание на свету протонного градиента [Гольцев и др., 2014; Crofts et al., 1971]. Загрязнения или факторы, влияющие на фосфорилирование, могут действовать на быструю и медленную фазы нарастания интенсивности ЗФ после включения света и, соответственно, влиять на электрическую (Ф) или собственно концентрационную (ДрН) составляющую электрохимического трансмембранного потенциала, приводящего к фосфорилированию [Dahse et al., 1986; Goltsev et al., 2009; Lenbaum et al., 2015].

Методы измерения ЗФ хлорофилла ранее достаточно широко использовались для изучения фукционирования фотосинтетического аппарата водорослей в разных условиях. В последнее время вновь началось активное изучение индукционных кривых ЗФ в миллисекундном интервале времени, что связано с выпуском новейших приборов для регистрации ЗФ (MPEA-2, HansaTech, Aнглия) (http://www.hansatech-instruments.com). Этот прибор позволяет проводить одновременную регистрацию индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также поглощение при длине 820 нм, отражающее изменения P₇₀₀. На этом приборе в последнее время проведен цикл работ по исследованию индукционных кривых ЗФ при действии различных токсикантов [Goltsev et al., 2009; Гольцев и др., 2014; Gabbasova et al., 2017; Zayadan et al., 2020; Todorenko et al., 2020]. В РФ для оценки влияния загрязнений на индукционные кривые быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла выпускается сертифицированный прибор «Фотон 10» (www.energolab.ru, разработчик Ю. Григорьев). ЗФ тесно связана с термолюминесценцией (ТЛ) хлорофилла, возникающей при нагревании предварительно освещенных листьев растений или водорослей [Vass, 2003; Tyystjärvi, Vass, 2004; Маторин и др., 2011]. При замораживании объекта во время освещения и последующем нагревании наблюдаются кривые термолюминесценции со значительным количеством пиков. Это связано с тем, что при нагревании освобождаются электроны, захваченные ловушками, и происходит излучательная ТЛ [Vass, 2003]. Регистрация ТЛ стала мощным инструментом в изучении стрессовых воздействий и токсического действия на растения тяжелых металлов и гербицидов [Маторин и др., 2011; Repetto et al., 2015].



Рис. 1. Схема реакции электронного транспорта ФС2, поясняющая происхождение различных компонент 3Ф. P_{680} и P_{680}^* — основное и возбужденное состояния хлорофиллов реакционного центра ФС2; Q_A и Q_B — первичный и вторичный акцепторы электронов; PQ — пластохинон; Z — тирозин белка D1; S_i — одно из состояний водоразлагающего комплекса. Толстые вертикальные стрелки отражают возбуждение реакционных центров хлорофилла (изогнутая стрелка — возбуждение от антенн) и эмиссию замедленной флуоресценции (3Ф). Внутри прямоугольника указаны состояния ФС2, которые определяют интенсивность замедленной флуоресценции и соответствующие времена жизни (τ_i). Безызлучательные переходы обозначены прерывистой стрелкой [Гольцев и др., 2014]

В области высоких температур на кривой ТЛ растений и водорослей нами была обнаружена высокотемпературная термолюминесценция (ВТЛ) с интен-

сивными пиками при 90 и 120 °C [Vavilin et al., 1998, 2002]. Метод регистрации ТЛ в диапазоне температур 50–150 °C позволяет достаточно определенно предсказывать наличие перекисей липидов в биологических хлорофиллсодержащих образцах [Маторин и др., 1989; Vavilin et al., 1998; Havaux, 2003].

Биомониторинг природного фитопланктона погружным флуориметром

На долю водорослей приходится почти половина фотосинтетической биологической продукции Земли. В водных экосистемах фитопланктон (планктонные микроводоросли) является одним из главных источников органического вещества. Поэтому для характеристики состояния водной среды необходимо определять обилие и состояние природного фитопланктона. В настоящее время активно развивается космический мониторинг морей и океанов, но он получает информацию только с поверхности моря. Однако важно определять, что происходит в толще воды под поверхностью, где наблюдаются скопления фитопланктона. Почти единственным методом, позволяющим *in situ* в режиме реального времени следить за живыми организмами в океане, является метод измерения флуоресценции фитопланктона [Fadeev et al., 1999; Antal et al., 2001; Ostrowska, et al., 2000a, b; Маторин и др., 2012].

Количество водорослей обычно оценивают по содержанию в них хлорофилла спектрофотометрическим методом. Более оперативными и чувствительными для решения этой задачи являются измерения интенсивности флуоресценции водорослей в природной воде. Флуоресцентный метод оценки концентрации хлорофилла и, соответственно, обилия водорослей нашел широкое применение в экологии и гидробиологии при работе как с интактными водорослями, так и с экстрагированными из них растворами пигментов [Falkowski, Raven, 1997; Ostrowska et al., 2000a, b; Маторин и др., 2012]. На основе флуоресценции на кафедре биофизики МГУ разработана «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом» (ФР.1.39.2011.11246, ПНД Ф 14.2.268-2012). Методика допущена для целей государственного экологического контроля по разделу «количественный химический анализ вод».

Для работ с фитопланктоном в природных условиях разработан ряд погружных устройств для зондирования флуоресценции. Существуют приборы, в которых флуоресценция возбуждается естественным освещением, однако в большинстве флуориметров применяется искусственное возбуждение постоянным или импульсным освещением. Для контактного зондирования флуоресценции могут быть использованы флуориметры, помещенные на борт судна или лодки, с применением отбора проб или проточных кювет, через которые посредством шланга или помпы непрерывно прокачивается вода, что позволяет осуществлять непрерывную запись свечения. Проточные флуориметры отличаются простотой и надежностью. Использование проточного флуориметра позволяет также проводить измерения содержания хлорофилла фитопланктона приповерхностных вод по ходу судна или вести непрерывный контроль этого показателя в течение длительного времени с платформы, и получаемая информация может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме. Для измерения фотосинтетических параметров культур водорослей и фитопланктона на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработан комплекс портативных приборов, включающий бортовой флуориметр, погружной и проточный флуориметры (www.biophys.msu.ru/Fluorometer PrimProd) [Pogosyan, Matorin, 2005; Маторин и др., 1996, 2012].

Погружной компактный зонд-флуориметр, разработанный на кафедре биофизики МГУ [Маторин и др., 1996, 2012] (рис. 2), способен работать до глубины 200 м и измерять параметры флуоресценции (F_0 , Fm и F_v/F_m) природного фитопланктона в естественных условиях с одновременной регистрацией температуры и подводной облученности.

Прибор состоит из погружаемого зонда с системами измерения, блока питания и компьютера, управляющего процессом измерений по программе, задаваемой пользователем. Измерение всех параметров производится автоматически и результаты выводятся на экран компьютера в реальном времени по мере погружения аппарата в виде графиков, отражающих вертикальный профиль температуры, подводной облученности, также концентрацию хлорофилла а, рассчитанную по величине F_0 в соответствие с калибровкой, и показатель эффективности фотосинтеза водорослей F_v/F_m. С помощью этого флуориметра могут быть получены данные об экологическом состоянии различных водоемов, построены глубинные разрезы и трехмерные карты распределения количества и активности фитопланктонных сообществ, температурных и оптических параметров водной среды и выявлены районы, подверженные антропогенному загрязнению. Эта информация важна для выбора типичных или градиентных зон обследуемой акватории. Большой массив данных, получаемых по ходу судна, позволяет сопоставить их со спутниковыми картами распределения хлорофилла в море. С применением этого погружного флуориметра было проведено зондирование состояния водной среды в Черном, Средиземном, Норвежском и Южно-Китайском морях и озерах Байкал и Иссык-Куль [Antal et al., 2001; Маторин и др., 1996, 2006; Ostrowska et al., 2000a, b; Ильяш, Маторин, 2007; Pogosyan, Matorin, 2005].



Рис. 2. (а) Схема зондирования погружным флуориметром с регистрацией параметров флуоресценции F_0 , F_v/F_m , температуры (t, °C), фотосинтетически активной радиации (ФАР): F_0 — обилие фитопланктона; F_v/F_m — фотосинтетическая активность; PP — фотосинтетическая продукция, рассчитанная по параметрам флуоресценции. (б) Фото разработанного погружного флуориметра на кораллах в Южно-Китайском море

Методы биотестирования на основе флуоресценции хлорофилла

Одним из основных требований, предъявляемых к оперативным биотестам, является высокая чувствительность к токсикантам различной природы. В целях

повышения чувствительности биотестов производится, во-первых, поиск наименее устойчивых к токсикантам организмов. Прежде всего это микроводоросли, являющиеся главными продуцентами в водоемах и своеобразными экологическими мишенями для токсикантов, поступающих в водные экосистемы [Маторин и др., 2007; Маторин, Алексеев, 2013; Заядан др., 2020; Vavilin et al., 1995]. Во-вторых, выбор наиболее чувствительных процессов в организмах по реагированию на токсическое воздействие. Для водорослей это, прежде всего, фотосинтез. Преимущества использования фотосинтеза в качестве тест-функции обусловлены высокой его чувствительностью к действию загрязнителей, так как при ингибировании токсикантами различных реакций метаболизма клетки избыточная энергия света, не используемая в реакциях фотосинтеза, вызывает появление активных форм кислорода, приводящих к фотодеструкции хлорофилла и клеточных структур. Большинство веществ, входящих в состав промышленных и бытовых стоков, способны оказывать токсическое действие на микроводоросли. В связи с этим водорослевые биотесты входят в число основных при нормировании качества вод [Руководство Минприроды РФ, 2002; ISO 8692, 2004; Жмур, Орлова, 2007; Маторин и др., 2009]. Оценка токсичности вод, в особенности питьевой воды, по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции является чрезвычайно актуальной [Маторин и др., 2007, 1990; Григорьев, Власова, 2009; Brack, Frank, 1998; Bengtson-Nash et al., 2005; Sanders et al., 2001; Greenbaum, 2004; Wang, Qiang, 2005].

Нами были отработаны научно-методологические подходы по использованию быстрой и замедленной флуоресценции в биотестировании различных загрязнений [Маторин и др., 1990, 2007]. Флуориметры позволяют регистрировать параметры флуоресценции хлорофилла культур водорослей для быстрого обнаружения в водной среде токсических веществ. Первый параметр — постоянная флуоресценция (F_0) — коррелирует с концентрацией водорослей в пробе и может служить для быстрой оценки скорости роста. Второй параметр — F_v/F_m характеризует фотосинтетическую активность водорослей. У водорослей в оптимальных условиях F_v/F_m близко к 0,7, а при действии токсикантов — уменьшается. У мертвых водорослей $F_v/F_m = 0$. Преимущества использования флуоресценции связаны с быстротой, низкой трудоемкостью процесса измерения, а также с ее высокой чувствительностью к действию токсикантов. Регистрация на свету первичных изменений фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительного к повреждающим воздействиям, позволяет сократить время инкубации до 1-3 ч по сравнению с 1-10 сут. при оценке токсичности по снижению скорости роста. Испытания метода на ряде модельных токсикантов (ионы Си, Hg, Cd, Cr, Zn, гербициды и др.) показали, что чувствительность его находится на уровне ПДК для этих веществ.

Наиболее чувствительны водоросли были к действию тяжелых металлов, гербицидов, оловоорганических соединений. Как показали результаты пробитанализа, токсичность веществ указанных групп для водорослей возрастала в следующей последовательности: цинк < свинец < кадмий < TПОХ < DCMU < хром < медь < ртуть. Пределы минимальных достоверно обнаруживаемых концентраций указанных веществ в краткосрочных экспериментах по разработанной нами методике составили от 1 (ртуть) до 200–300 мкг/л (цинк). Экспериментально установленные максимальные концентрации веществ, не оказывавшие достоверного действия как на интенсивную культуру хлореллы (по F_{v}/F_m) в суточных опытах, так и на стандартную культуру хлореллу в хронических опытах продолжительностью 10–25 сут. (наши данные и из различных литературных источников) приведены в таблице 1. Видно близкое соответствие результатов, полученных при использовании разработанного нами и стандартного водорослевого теста.

Таблица 1	۱.	Максимальные	не	действовавшие	на	хлореллу	кон	нцентра	аци	и некоторых
токсикантс)в,	определенные	c	использованием	фл	уоресценц	ии	F_v/F_m	И	стандартным
методом по скорости роста культуры										

	Концентрации, мкг/л						
Токсикант	По нашей методикеПо стандартной(в суточных опытах)методике (в 10–25-на интенс. культуре)суточных опытах)		ПДК для рыб. хоз. водоемов				
Ртуть	0,5	0,1–1	0,1				
Медь	5	5–10	1				
Кадмий	10	10	10				
Свинец	10	10–50	100				
Бихромат калия	100	50-100	—				
Цинк	100	50-200	50				
DCMU	5	10	—				
ТПОХ	2–3	5	1				
Фруорантен	100	_	—				
Фенантрен	500						
Карбофос	5×10 ⁵		0				
Хлордодецил- сульфат Na (ПАВ)	5×10 ⁴	10 ⁵					

Флуоресценция хлорофилла официально введена в сертифицированную методику для использования при биотестировании [Жмур, Орлова, 2007]. Методика выполнения измерений обеспечивает выполнение измерений с низкой погрешностью. Учитывая кратковременность экспериментов и предусмотренную методикой возможность жесткого контроля за условиями проведения опытов, разброс измеряемых параметров в повторах относительно низкий.

Важным, но не получившим пока должного развития, направлением является изучение влияния условий инкубирования тест-объектов и, в частности, использование наряду с токсической дополнительной физиологической нагрузки на тест-объект, не выходящей по интенсивности за пределы его толерантности [Маторин и др., 2009]. Важность исследований действия токсикантов при дополнительных физиологических нагрузках обусловлена еще и тем, что в природе организмы испытывают практически постоянный стресс со стороны различных природных факторов [Филенко, 1988]. Световая энергия определяет интенсивность фотосинтеза, рост и развитие водорослей. В то же время при действии света повышенной интенсивности могут развиваться длительные и глубокие перестройки фотосинтетического аппарата, которые отражают развитие процесса фотоингибирования фотосинтеза и включение защитных процессов безизлучательной диссипации избыточной световой энергии. Показано усиление у водорослей в присутствии токсикантов процессов фотоингибирования и замедление реакций восстановления в темноте после прекращения фотоокислительного стресса [Маторин и др., 2009; Gabbasova et al., 2017].

Для быстрого и достоверного обнаружения токсического действия низких концентраций тяжелых металлов нами предложено использование дополнительного светового стресса, не выходящего по степени действия за пределы толерантности тест-объекта, но значительно увеличивающего чувствительность водорослей к действию токсикантов. Применение дополнительной физиологической нагрузки на тест-объект позволяет не только сократить продолжительность выявления интоксикации, но и снизить пределы достоверного обнаружения токсикантов. В заключение следует отметить, что световой стресс может быть легко реализован во флуоресцентной аппаратуре для биотестирования и включен в систему оперативного контроля за токсичностью природных и сточных вод.

Также активно в настоящее время используют регистрацию замедленной флуоресценции (3Ф) для оценки действия на водоросли различных токсикантов и гербицидов [Маторин и др., 2011, 2014; Dahse et al., 1986; Vasil'ev et al., 1990]. В частности, с использованием миллисекундной 3Ф продемонстрированы ранние эффекты токсического действия цинка, кобальта, кадмия, связанные со снижением энергизации тилакоидных мембран клеток водоросли [Маторин и др., 2009, 2014]. Применимость измерения долгоживущих компонент 3Ф со временем затухания 0,2 с и дольше для биотестирования на токсичность была

продемонстрирована в работах [Berden-Zrimec et al., 2007; Katsumata et al., 2006]. Было показано, что, измеряя 3Φ , можно оценивать живую биомассу водорослей и, соответственно, использовать в стандартном биотесте на токсичность [ISO 8692, 2004]. Токсичность в этой модификации возможно определять уже после 24 ч, а в некоторых случаях даже после 15 или 30 мин инкубации по сравнению со стандартным методом (72 ч) [Berden-Zrimec et al., 2011; Katsumata et al., 2008]. Кроме того, некоторые токсины (например, гербициды) влияют на долгоживущую кинетику затухания 3Φ , что может быть использовано для большей избирательности биотестирования [Berden-Zrimec et al., 2011; Katsumata et al., 2008].

Сравнительные исследования чувствительности водорослей к разным токсикантам с использованием параметров быстрой и замедленной флуоресценции показали, что для соединений фенолов, влияющих на энергизацию фотосинтетических мембран и процессы фосфорилирования, параметры 3Ф более информативны по сравнению с параметром флуоресценции F_v/F_m [Маторин и др., 2012, 2014]. Метод миллисекундной 3Ф введен в сертифицированную методику по определению острой токсичности различных вод и отходов [Григорьев, Власова, 2009].

Использование описанных выше методов анализа световых и индукционных зависимостей флуоресценции позволяет оценить специфичность действия токсикантов на фотосинтетические процессы и таким образом определить, к какому классу относится токсический агент. На рис. 3 представлены характерные изменения кинетики индукции флуоресценции у морских водорослей после обработки солями метилртути и известными ингибиторами транспорта электронов и разобщителями фосфорилирования. Вверху указаны места действия этих веществ на отдельные стадии фотосинтеза. Анализ этих изменений индукции флуоресценции позволяет выявлять специфические места влияния различных антропогенных загрязнений на фототрофные организмы.

Использование флуоресценции хлорофилла для регистрации пищевой активности планктонных ракообразных

Флуориметры могут быть применены также для биотестирования воды путем регистрации пищевой активности второй по значимости группы биотестов — планктонных ракообразных (F_O) [Маторин и др., 2009]. Дафниевый тест, основанный на оценке выживаемости, плодовитости и качества потомства, относится к числу основных при нормировании качества природных и сточных вод во многих странах мира. В работах [Маторин и др., 1990, 2009] было показано, что одной из первичных реакций дафний на действие токсикантов является изменение активности их питания, происходящее задолго до возможной гибели тест-объекта.



Изменение концентрации водорослей в процессе их выедания рачками Daphnia magna можно определять по уменьшению параметров быстрой или замедленной флуоресценции [Маторин и др., 1990, 2009]. Методика оценки токсичности вод по скорости поглощения водорослей дафниями с использованием флуоресцентного метода обеспечивает выполнение биотестирования с высокой достоверностью. Максимальные концентрации веществ, обнаруживаемые данным методом в суточных опытах, были близки к ПДК для рыбохозяйственных водоемов, установленных для этих веществ. На рис. 4 представлены результаты пробит-анализа токсического действия разных веществ на активность питания дафний с использованием параметров флуоресценции хлорофилла. Важно отметить, что параллельно на той же флуоресцентной аппаратуре возможна оценка влияния токсических веществ на фотосинтетическую активность микроводорослей. С использованием обоих методов нами проведено исследование детоксицирующих свойств гуминовых веществ различного генезиса по отношению к тяжелым металлам, гербицидам и ПАУ [Perminova et al., 2001]. Таким образом, появляется возможность на одном приборе определять токсичность воды сразу для двух важнейших компонентов водных экосистем: микроводорослей, являющихся первичными продуцентами органического вещества, и планктонных ракообразных, основных потребителей этого вещества, являющихся, в свою очередь, пищей для рыб и других организмов более высоких трофических уровней.



Рис. 4. Результаты пробит-анализа токсического действия указанных веществ на активность питания дафний с использованием параметров флуоресценции хлорофилла. Длительность опытов — 1 сут. DCMU — диурон, ТПОХ — трипропилоловохлорид

Биотестирование токсического действия наноматериалов с использованием быстрой и замедленной флуоресценции микроводорослей

Наноматериалы получили широкое применение в производстве товаров широкого потребления, технике и медицине. Увеличение их производства приводит к увеличению их выброса в окружающую среду. Поэтому чрезвычайно важной является оценка экологических последствий влияния их на экосистемы [Шайтан, 2011]. Наночастицы и наноматериалы обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий. В наноразмерном состоянии можно выделить следующие физико-химические особенности поведения веществ: увеличение химического потенциала веществ на межфазной границе высокой кривизны (большая кривизна поверхности наночастиц и изменение топологии связи атомов на поверхности приводит к изменению их химических потенциалов, вследствие этого существенно изменяется растворимость, реакционная и каталитическая способность наночастиц и их компонентов); большая удельная поверхность наноматериалов, что увеличивает их адсорбционную емкость, химическую реакционную способность и каталитические свойства и приводит к увеличению продукции свободных радикалов и активных форм кислорода и повреждению биологических структур; небольшие размеры и разнообразие форм наночастиц (наночастицы, вследствие своих небольших размеров, могут связываться с нуклеиновыми кислотами, белками, встраиваться в мембраны, проникать в клеточные органеллы и, тем самым, изменять функции биоструктур); высокая адсорбционная активность (в связи с высокоразвитой поверхностью наночастицы обладают свойствами высокоэффективных адсорбентов и способны поглощать на единицу своей массы во много раз больше адсорбируемых веществ, чем макроскопические дисперсии); высокая способность к аккумуляции. Все перечисленное свидетельствует о том, что наноматериалы, обладающие иными физико-химическими свойствами и биологическим действием по сравнению с традиционными аналогами, следует отнести к новым видам материалов и продукции, характеристика потенциального риска которых для здоровья человека и состояния окружающей среды является обязательной [Шайтан, 2011; Маторин и др., 2018].

Применение быстрой или замедленной флуоресценции водорослей в качестве биосенсоров можно с успехом использовать для тестирования наноматериалов. Многие наночастицы делаются с содержанием различных металлов, в том числе и тяжелых металлов. Это может приводить к их высокой токсичности, способности накапливаться в организмах и передаваться по трофической цепи. Показано, что при культивации клеток водоросли *Chlorella vulgaris* в водных дисперсных системах происходит накопление наночастиц диоксида титана с коэффициентом 200. Среди метаболических процессов внутри растительной клетки наиболее чувствительным к действию тяжелых металлов является фотосинтез [Joshi, Mohanty, 2004]. Соответственно, подход с применением флуоресценции может быть легко использован для наноматериалов, содержащих металлы [Wang, Qiang, 2005].

В большинстве работ по действию наночастиц на водоросли исследовалось ингибирование роста или изменение морфологии клеток водорослей. В наших экспериментах обнаружено влияние наночастиц серебра, нанотрубок, наноалмазов и нанокомпозитов на флуоресценцию водорослей и растений [Маторин и др. 2009, 2012; Юрищева и др., 2011; Matorin et al., 2013; Terekhova et al., 2014; Chernysheva et al., 2018]. В таблице 2 в качестве примера представлены данные по влиянию нанотрубок на параметры световых кривых флуоресценции.

Таблица 2. Влияние углеродных нанотрубок (диаметр 1,2–1,4 нм) производства компании NanoCarbLab на параметры флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (суточная инкубация). F_v/F_m — параметры проб в темноте; $Y = (F_m' - F_t)/F_m'$ — фотохимическая активность ФС2 на свету; параметры, описывающие зависимость электронного транспорта (rETR) от освещенности (световые кривые): коэффициент максимальной утилизации световой энергии, угол наклона световой кривой (α), максимальная относительная скорость нециклического транспорта электронов (rETR_{max}) и насыщающая интенсивность света ($E_{\rm H}$)

Параметры	Иситрони	SW трубки	MW трубки	MW трубки	
флуоресценции	контроль	(2 мкг/мл)	(1 мкг/мл)	(2 мкг/мл)	
F_{v}/F_{m}	$0,73 \pm 0,001$	$0,70 \pm 0,01$	$0,\!68 \pm 0,\!01$	$0,57 \pm 0,03$	
<i>Y</i> (при 400 мкЕм ⁻² с ⁻¹)	$0,17 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,03$	
ETR _{max}	$23,8 \pm 1,7$	$22,7 \pm 1,3$	$20,6 \pm 1,5$	$17,9 \pm 0,9$	
α	$0,23 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	$0,168 \pm 0,01$	$0,149 \pm 0,03$	
$E_{\rm H}$ (мкЕм ⁻² c ⁻¹)	$120,2 \pm 14,2$	$124,1 \pm 13,5$	$137,9 \pm 10,5$	$136,3 \pm 14,5$	

Флуоресцентные методы перспективно использовать также для мониторинга токсического влияния наноматериалов или продуктов их использования на важнейший компонент водных экосистем — природный фитопланктон [Matorin et al., 2012]. С использованием флуоресценции нами показано влияние разных наночастиц на природный фитопланктон Белого моря (таблица 3). Наблюдали снижение максимального квантового выхода Φ C2 (F_{ν}/F_m) и скорости нециклического электронного транспорта у фитопланктона под влиянием наночастиц серебра, золота, алмаза, нанокомпозита Fe₃O₄/HA_{mech}. Особенно значительное ингибирование фотосинтеза фитопланктона наблюдалось при воздействии коллоидного раствора, содержащего наночастицы серебра в рекомендованном для медицины препарате «Аргоника». Эффект отмечался при концентрациях даже 10⁻⁸ М. Наночастицы золота мало изменяли фотосинтетическую активность фитопланктона даже в высоких концентрациях. Параметр нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), связанный с энергизацией мембран, также уменьшался при действии исследованных наночастиц. Только наночастицы золота увеличивали этот параметр. Наночастицы алмаза в концентрации 0,01 % также влияли на фитопланктон.

Таблица 3. Изменения параметров флуоресценции: F_v/F_m — пробы в темноте; rETR_{max} — максимальная относительная скорость электронов по электрон-транспортной цепи и NPQ = $(F_m/F_m') - 1$ — нефотохимическое тушение флуоресценции при 800 мкЕм⁻²c⁻¹ у природного фитопланктона после добавления разных нанопрепаратов (время инкубации — 20 ч), в процентах от контроля

Параметры флуоресценции	Контроль	Нанозолото [Au] 10 ⁻⁴ М	Алмазные наночастицы (0,01 %)	Наносеребро 10 ⁻⁵ М	Коллоидное серебро в препарате «Аргоника» 10 ⁻⁷ М	Нанокомпозит Fe ₃ O ₄ /HA _{mech} (0,005 %)
F_{v}/F_{m}	100 %	97 %	46,2 %	76 %	37 %	69 %
ETR _{max}	100 %	83 %	23 %	43 %	19 %	48 %
NPQ	100 %	129 %	23 %	53 %	29 %	55 %

Таким образом, проведенные исследования указывают на возможность использования этих флуоресцентных характеристик микроводорослей для экспресс-обнаружения в природной водной среде загрязнений, включая и наноматериалы в достаточно низких концентрациях. Проведения диагностики на ранних стадиях воздействия токсикантов на фитопланктон до появления видимых нарушений в водных экосистемах, может позволить вовремя осуществить природоохранные мероприятия.

Литература

Гольцев В. Н., Каладжи М. Х., Кузманова М. А., Аллахвердиев С. И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *а* — теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. — М.–Ижевск: ИКИ-РХД, 2014.

- Григорьев Ю. С., Власова Е. С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (Chlorella vulgaris Beijer). ФР.1.31.2009.06643. — М., 2009.
- Жмур Н. С., Орлова Т. Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. ФР.1.39.2007.03223. — М.: Акварос, 2007.
- Заядан Б. К., Садвакасова А. К., Маторин Д. Н. Биоремедиация и мониторинг загрязненных водных экосистем на основе микроводорослей. М.: Альтрекс, 2020.
- Ильяш Л. В., Маторин Д. Н. Особенности пространственного распределения фитопланктона залива Нячанг Южно-Китайского моря в период интенсивных осадков // Океанология. — 2007. — Т. 47, № 6. — С. 847–856.
- Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. — К.: Альтерпрес, 2002. — 188 с.
- Котелевцев С. В., Маторин Д. Н., Садчиков А. П. Экологическая токсикология и биотестирование водной среды. М.: Инфра-М, 2015.
- Маторин Д. Н., Венедиктов П. С., Конев Ю. Н., Казимирко Ю. В., Рубин А. Б. Использование двухвспышечного импульсного погружного флуориметра для определения фотосинтетической активности природного фитопланктона // Докл. РАН. — 1996. — Т. 350, № 2. — С. 256–258.
- Маторин Д. Н., Рубин А. Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. — М.–Ижевск: ИКИ-РХД, 2012.
- Маторин Д. Н., Алексеев А. А. Флуоресценции хлорофилла для биодиагностики растений. — М.: Альтрекс, 2013.
- Маторин Д. Н., Братковская Л. Б., Яковлева О. В., Венедиктов П. С. Биотестирование токсичности вод по скорости поглощения дафниями микроводорослей, регистрируемых с помощью флуоресценции хлорофилла // Вестн. моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2009. № 3. С. 28–33.
- Маторин Д. Н., Вавилин Д. В., Венедиктов П. С. О возможности использования флуоресцентных методов для изучения питания ракообразных // Биол. науки. — 1990. — Т. 1. — С. 147–152.
- Маторин Д. Н., Каратеева А. В., Осипов В. А., Лукашев Е. П., Сейфуллина Н. Х., Рубин А. Б. Влияние углеродных нанотрубок на параметры флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardtii // Российские нанотехнологии. — 2010. — Т. 5. — С. 321–328.
- Маторин Д. Н., Осипов В. А., Венедиктов П. С., Рубин А. Б. Замедленная флуоресценция растений и водорослей. Теоретические и практические аспекты. — М.: Альтрекс, 2011.
- Маторин Д. Н., Осипов В. А., Рубин А. Б. Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты: учеб.-метод. пособие. — М.: Альтрекс, 2012.

- Маторин Д. Н., Осипов В. А., Сейфуллина Н. Х., Венедиктов П. С., Рубин А. Б. Усиление токсического действия метилртути на микроводоросли Chlorella vulgaris под действием светового и холодового стресса // Микробиология. — 2009. — Т. 78, № 3. — С. 362–368.
- Маторин Д. Н., Яковлева О. В. Фотолюминесценция растений. М.: Альтрекс, 2019.
- Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов / Министерство природных ресурсов РФ. РЭФИА. НИА. — М.: Природа, 2002.
- Терехова В. А., Воронина Л. П., Гершкович Д. М., Ипатова В. И., Исакова Е. Ф., Котелевцев С. В., Попутникова Т. О., Рахлеева А. А., Самойлова Т. А., Филенко О. Ф. Биотест-системы для задач экологического контроля: Методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур. — М.: Доброе слово, 2014.
- Филенко О. Ф. Водная токсикология. М.: Черноголовка, 1988.
- Шайтан К. В. Основы нано- и биобезопасности. М.: НОУДПО, Институт АйТи, 2011.
- Юрищева А. А., Помогайло С. И., Тимофеев М. А., Пукальчик М. Н., Рахлеева А. А., Кыдралиева К. А., Маторин Д. Н., Терехова В. А. Нанокомпозитный сорбент для очистки природных сред и его экотоксикологическая оценка // Экология и промышленность России. 2011. С. 50–54.
- Allakhverdiev S. I. Recent progress in the studies of structure and function of photosystem II // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 2011. Vol. 104. P. 1–8.
- Amesz J., Gorkom U. J. Delayed fluorescence in photosynthesis // Ann. Rev. Plant Physiol. 1978. — Vol. 29. — P. 47–66.
- Antal T. K., Matorin D. N., Ilyash L. V., Volgusheva A. A., Osipov V. A., Konyuhov I. V., Krendeleva T. E., Rubin A. B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // Photosynth. Res. — 2009. — Vol. 102. — P. 67–76.
- Antal T. K., Osipov V. A., Matorin D. N., Rubin A. B. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic electron transport in the marine diatom Thalassiosira weissflogii // Photochem. Photobiol. Biol. 2011. Vol. 102. P. 169–173.
- Antal T. K., Venediktov P. S., Matorin D. N., Ostrowska M., Wozniak B., Rubin A. B. Measurement of phytoplankton photosynthesis rate using a pump-and-probe fluorometer // Oceanologia. — 2001. — Vol. 43, No. 3. — P. 291–313.
- Baker N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo // Ann. Rev. Plant Biol. 2008. Vol. 59. P. 659–668.
- Bengtson-Nash S. M., Schreiber U., Ralph P. J., Müller J. F. The combined SPE:ToxY-PAM phytotoxicity assay; application and appraisal of a novel biomonitoring tool for the aquatic environment // Biosensors and Bioelectronics. — 2005. — Vol. 20. — P. 1443– 1451.
- Berden-Zrimec M., Drinovec L., Zrimec A. M. Delayed Fluorescence // Suggett D. J. et al. (eds.). Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. Developments in applied. — Phycology 4. — Springer Science, 2011. — P. 293–309.

- Brack W., Frank H. Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 40, No. 1–2. P. 34–41.
- Chernysheva M. G., Myasnikov I. Yu., Badun G. A., Matorin D. N., Gabbasova D. T., Konstantinov A. I., Korobkov V. I., Kulikova N. A. Humic substances alter the uptake and toxicity of nanodiamonds in wheat seedlings // J. of Soils and Sediments. — 2018. — Vol. 18, No. 4. — P. 1335–1346.
- Crofts A. R., Wright C. A., Fleischmann D. E. Energy conservation in the photochemical reactions of photosynthesis and its relation to delayed fluorescence // FEBS Lett. — 1971. — Vol. 15, No. 1. — P. 89–100.
- Dahse J., Matorin D. N., Liebermann B. A comparison of tentoxin action on the delayed fluorescence chloroplasts of Spinach, Chlorella and Anasystis // Biochem. Physiol. Pflanzen. — 1986. — Vol. 181. — P. 137–146.
- Evans E. H., Crofts A. T. The relationship between delayed fluorescence and the H+ gradient in chloroplasts // Biochim. Biophys. Acta. 1973. Vol. 292, No. 2. P. 130–139.
- Fadeev V. V., Filippova E. M., Maslov D. V., Matorin D. N., Venediktov P. S. Diagnostics of photosynthesising organisms by linear and non-linear fluorimetry // Proc. of SPIE. — 1999. — Vol. 3821. — P. 102–111.
- Falkowski P. G., Raven J. A. Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, 1997.
- Gabbasova D. T., Matorin D. N., Konyukhov I. V., Seifullina N. Kh., Zayadan B. K. Effect of chromate ions on marine microalgae Phaeodactylum tricornutum // Microbiology. — 2017. — Vol. 86, No. 1. — P. 54–62.
- Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R. J. Delayed fluorescence in photosynthesis // Photosynth. Res. 2009. Vol. 101. P. 217–232.
- Goltsev V. N., Ortoidze T. V., Sokolov J. N., Matorin D. N., Venediktov P. S. Delayed luminescence yield kinetics in flash illuminated green plants // Plant Sci. Lett. — 1980. — Vol. 19. — P. 339–346.
- Govindjee, Jursinic P. A. Photosynthesis and fast changes in light emission by green plants // Photochemical and Photobiological Reviews / K. C. Smith (ed.). New York: Plenum Press, 1979. Vol. 4. P. 125–205.
- Greenbaum E. Biosensors for rapid monitoring of primary-source drinking water // Water and Sustainable Development: Opportunities for the Chemical Sciences. A Workshop Report to the Chemical Sciences Roundtable Ac. Press, 2004. P. 47–52.
- Havaux M. Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants // Trends Plant Sci. 2003. Vol. 8. P. 409–413.
- Horváth G. Usefulness of thermoluminescence in herbicide research // Crit. Rev. Plant Sci. 1986. Vol. 4. P. 293–310.
- Il'yash L. V., Belevich T. A., Matorin D. N. Fluorescence parameters of White Sea phytoplankton under different nitrogen sources // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2013. — Vol. 68 (1). — P. 44–48.

- ISO 8692. Water quality Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. — Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2004.
- Joshi M. K., Mohanty P. Chlorophyll fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants // Papageorgiou G., Govindjee (eds.). Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. — Springer, 2004. — P. 637–661.
- Kalaji H. M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I. A., Ladle R. J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions // Acta physiologiae plantarum. — 2016. — Vol. 38, No. 4. — P. 102–122.
- Kalaji H. M., Schansker G., Ladle R. J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S., Elsheery N. I. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues // Photosynthesis Res. — 2014. — No. 2. — P. 121–158.
- Katsumata M., Takeuchi A., Kazumura K., Koike T. New feature of delayed luminescence: preillumination-induced concavity and convexity in delayed luminescence decay curve in the green alga Pseudokirchneriella subcapitata // J. Photochem. Photobiol. B. 2008. Vol. 90. P. 152–162.
- Lavorel J. Luminescence // Bioenergetics of Photosynthesis / Govindjee (ed.). New York: Acad. Press, 1975. P. 223–317.
- Lazar D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light // Funct. Plant Biol. 2006. Vol. 33. P. 9–30.
- Lenbaum V. V., Bulychev A. A., Matorin D. N. Effects of far red light on the induction changes of prompt and delayed fluorescence and the redox state of P₇₀₀ in Scenedesmus quadricauda // Russian J. of Plant Physiol. — 2015. — Vol. 62, No. 2. — P. 210–218.
- Malkin S. Delayed Luminescence // Primary Processes in Photosynthesis / J. Barber (ed.). Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1977. P. 351–431.
- Matorin D. N., Todorenko D. A., Seifullina N. Kh., Zayadan B. K., Rubin A. B. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P₇₀₀ reaction in the green alga Chlamydomonas reinhardtii // Microbiology. 2013. Vol. 82, No. 6. P. 862–867.
- Matorin D. N., Antal T. K., Ostrowska M., Rubin A. B., Ficek D., Majchhrowski R. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // Oceanologia. — 2004. — Vol. 46, No. 4. — P. 519–531.
- Matorin D. N., Plekhanov S. E., Bratkovskaia L. B., Iakovleva O. V., Alekseev A. A. The effect of phenols on the parameters of chlorophyll fluorescence and reaction of P700 in the green algae Scenedesmus quadricauda // Biophysics. 2014. Vol. 59, No. 3. P. 458–465.
- Matorin D. N., Vuksanovich N., Rubin A. B., Venediktov P. S. Application of chlorophyll fluorescence in studied of phytoplankton in the Mediterranean Sea // Studia Marina. — 2002. — Vol. 23. — P. 79–86.
- Matorin D. N., Timofeev N. P., Sindalovskaya M. L., Shidlovskaya N. A., Todorenko D. A., Alekseev A. A. Chlorophyll fluorescence of summer phytoplankton in reservoirs of the

Zvenigorod biological station of Moscow State University // Biophysics. — 2019. — Vol. 64, No. 6. — P. 860–867.

- Mohammed G. H., Binder W. D., Gillies S. L. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation // Scandinavian Journal of Forest Research. — 1995. — Vol. 10. — P. 383–410.
- Moiseeva N. A., Churilova T. Ya, Efimova T. V., Matorin D. N. Correction of the chlorophyll a fluorescence quenching in the sea upper mixed layer: Development of the algorithm // Phys. Oceanography. 2020. Vol. 27, No. 1. P. 60–68.
- Mosharov S. A., Sergeeva V. M., Sazhin A. F., Kremenetskiy V. V., Stepanova S. V. Fluorescence parameters of photosynthetic activity of phytoplankton in the eastern part of the Kara Sea at the end of the vegetation season // Estuarine, Coastal and Shelf. Science. — 2019. — Vol. 218. — P. 59–69.
- Mosharova I. V., Il'inskii V. V., Matorin D. N., Mosharov S. A., Akulova A. Yu., Protopopov F. F. Monitoring of the Moskva river water using microbiological parameters and chlorophyll a fluorescence // Microbiology. — 2015. — Vol. 84, No. 6. — P. 811– 821.
- Ostrowska M., Majchrowski R., Matorin D. N., Woźniak B. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 1. Theory of classical in situ chlorophyll fluorometry // Oceanologia. — 2000a. — Vol. 42 (2). — P. 203–219.
- Ostrowska M., Matorin D. N., Ficek D. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 2. Fluorometric method of chlorophylla determination // Oceanologia. 2000b. Vol. 42 (2). P. 221–229.
- Perminova I. V., Grechishcheva N. Yu., Kovalevskii D. V., Kudryavtsev A. V., Petrosyan V. S., Matorin D. N. Quantification and prediction of the detoxifying effects of humic substances related to their chemical binding to polycyclic aromatic hydrocarbons // Environ. Toxicol. Chem. — 2001. — Vol. 35. — P. 3841–3848.
- Pogosyan S. I., Matorin D. N. Variability in the state of the photosynthetic system of the Black Sea phytoplankton // Oceanology. 2005. Vol. 45, No. 1. P. 139–148.
- Protopopov F. F., Matorin D. N., Seifullina N. Kh., Bratkovskaya L. B., Zayadan B. K. Effect of methylmercury on the light dependence fluorescence parameters in a green alga Chlamydomonas moewusii // Microbiology. — 2015. — Vol. 84, No. 6. — P. 822–827.
- Radenovic C., Markovic D., Jeremic M. Delayed chlorophyll fluorescence in plant models // Photosynthetica. 1994. Vol. 30. P. 1–24.
- Ralph P. J., Gademann R. Rapid light curves: a powerfull tool to assess photosynthetic activity // Aquat. Bot. — 2005. — Vol. 82. — P. 222–237.
- Repetto G., Zurita J. L., Roncel M., Ortega J. M. Thermoluminescence as a complementary technique for the toxicological evaluation of chemicals in photosynthetic organisms // Aquatic Toxicology. — 2015. — Vol. 158. — P. 88–97.
- Sanders Ch. A., Rodriguez M., Greenbaum E. Stand-off tissue-based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction // Biosensors and Bioelectronics. — 2001. — Vol. 16. — P. 439–446.

- Schreiber U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview // Chlorophyll a fluorescence. advances in photosynthesis and respiration / G. C. Papageorgiou and Govindjee (eds.). Dordrecht: Springer, 2004. P. 279–319.
- Serodio J., Vieira S., Cruz S., Barroso F. Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence // Mar. Biol. — 2005. — Vol. 146. — P. 903–914.
- Shchegolkova N., Shurshin K., Pogosyan S., Voronova E., Matorin D., Karyakin D. Microalgae cultivation for wastewater treatment and biogas production at Moscow wastewater treatment plant // Water science and technology. — 2018. — Vol. 77, No. 6. — P. 69–80.
- Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: Basis and applications of the OJIP fluorescence transient // J. Photochem. Photobiol. B. — 2011. — Vol. 104. — P. 236–257.
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., Qiang Sheng, Goltsev V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant Haberlea rhodopensis // Biochim. Biophys. Acta. — 2010. — Vol. 1797. — P. 1313–1326.
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of chlorophyll a fluorescence transient // Papageorgiou G. C., Govindjee (eds.). Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. — Dordrecht–Boston–London: Kluwer Academic Publishers, 2004. — Vol. 19. — P. 321–362.
- Strehler B. L., Arnold W. Light production by green plants // J. Gen. Phys. 1951. Vol. 34. — P. 809–820.
- Terekhova V. A., Kydralieva K. A., Matorin D. N., Lisovitskaya O. V., Yurishcheva A. A. Biological activity of nanocomposite detoxicant in biotest-systems // Environmental Indicators. — 2014. — Vol. 8. — P. 4–14. — www.environmentalindicators.net
- Todorenko D. A., Slatinskaya O. V., Hao J., Seifullina N. Kh., Radenović Č. N., Matorin D. N., Maksimov G. V. Photosynthetic pigments and phytochemical activity of photosynthetic apparatus of maize (Zea mays L.) leaves under the effect of thiamethoxam // Agricultural Biol. — 2020. — Vol. 55, No. 1. — P. 66–76.
- Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I. B., Kukarskikh G. P., Matorin D. N., Antal T. K. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (Pisum sativum L.) // Planta. 2020. Vol. 251. P. 11–23.
- Tyystjärvi E., Vass I. Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence // Chlorophyll Fluorescence A. Signature of Photosynthesis / G. Papageorgiou, Govindjee (eds.). Orlando, Florida: Acad. Press, 2004. P. 363–388.
- Vasil'ev I. R., Komarov A. I., Matorin D. N., Verkhoturov V. N., Venediktov P. S. Two types of PS II centers as manifested by light saturation of delayed fluorescence from DCMUtreated chloroplasts // Photosynth. Res. — 1990. — Vol. 26, No. 2. — P. 34–38.
- Vass I. The history of photosynthetic thermoluminescence // Photosynth. Res. 2003. Vol. 76. P. 303–318.

- Vavilin D. V., Polynov V. A., Matorin D. N., Venediktov P. S. The subletal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in Chlorella pyrenoidosa // J. Plant Physiol. — 1995. — Vol. 146. — P. 609–613.
- Vavilin D. V., Ducruet J. M., Matorin D. N., Venediktov P. S., Rubin A. B. Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green alga Chlorella pyrenoidosa subjected to various stress conditions // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. — 1998. — Vol. 42. — P. 233–239.
- Vavilin D. V., Matorin D. N., Rubin A. B. High-temperature thermoluminescence of chlorophyll as a method to study lipid peroxidation in planktonic algae // Archiv Fur Hydrobiol. — 2002. — Vol. 153. — P. 685–701.
- Vavilin D. V., Ducruet J. M. The origin of 115–130 °C thermoluminescence bands in chlorophyll-containing material // Photochem. Photobiol. — 1998. — Vol. 68. — P. 191–198.
- Védrine Ch., Leclerc J.-C., Durrieu C., Tran-Minh C. Optical whole-cell biosensor using Chlorella vulgaris designed for monitoring herbicides // Biosensors and Bioelectronics. — 2003. — Vol. 18 (4). — P. 457–463.
- Wang J., Qiang Hu. Old bottle with new wine: algal indicators for nanotechnology-based toxicology // Electronic J. of Biol. — 2005. — Vol. 1. — P. 9–13.
- Zayadan B. K., Sadvakasova A. K., Matorin D. N., Akmukhanova N. R., Kokocinski M., Timofeev N. P., Balouch Kh., Bauenova M. O. Effect of cadmium ions on some biophysical parameters and ultrastructure of Ankistrodesmus sp. B-11 cells // Russian J. of Plant Phys. — 2020. — Vol. 67. — P. 845–854.

Prospects for fluorescence of chlorophyll in microalgae in bioindication and biotesting of ecotoxicants

D. N. Matorin

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia E-mail: dnmatorin@mail.ru

The chapter outlines scientific and methodological approaches to the use of parameters of fast and delayed fluorescence of chlorophyll for biotesting contamination. Specific examples of the use of these methods in studying the effect of various ecotoxicants and nanomaterials are given.

Keywords: microalgae, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, delayed fluorescence, biotesting.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИНАМИКА: ЭМЕРДЖЕНТНОСТЬ, МНОГОСВЯЗНОСТЬ, (НЕ)ПРЕДСКАЗУЕМОСТЬ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ СЛОЖНОСТИ ЭКОСИСТЕМНЫХ ПРОЦЕССОВ

А. Б. Медвинский, Н. И. Нуриева, А. В. Русаков¹

Сложность популяционной динамики накладывает существенные ограничения на исследования механизмов, лежащих в основе этой динамики. Мы анализируем влияние характерных особенностей, определяющих сложность динамических процессов, на математическое моделирование конкретных экосистем. Мы обсуждаем пути преодоления сугубо редукционистского подхода к исследованию сложных систем.

Ключевые слова: популяционная динамика, математическое моделирование, эмерджентность, сложность структуры популяционных систем, предсказуемость динамических процессов.

1. Эмерджентность как свойство популяционной динамики

Термин «сложность» не вполне нейтрален. На наш взгляд, он несет в себе отзвук того удивления, которое испытывает человек, столкнувшийся с многоликостью, свойственной многим природным и социальным системам и процессам. Та эмоциональность, которая присуща термину «сложность», по-видимому, не предполагает его строгое определение. Тем не менее некоторые структурные и динамические особенности характерны именно для таких систем, которые представляются нам сложными. К таким характерным особенностям сложных систем относятся:

(1) эмерджентность;

- (2) многокомпонентность структуры;
- (3) нерегулярность динамики, характеризующейся ограниченной во времени предсказуемостью.

Рассмотрим их — в применении к популяционной динамике — последовательно.

Под эмерджентностью обычно понимают несводимость свойств целостной системы к сумме свойств ее компонент. Эмерджентное поведение присуще, например, рыбным стаям. Движение каждой из рыб в стае зависит от усредненно-

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область, 142290.

E-mail: alexander_medvinsky@yahoo.com

го направления движения ее соседей. В результате может возникать достаточно сложное поведение стаи как целого. Такое поведение, в частности, позволяет стае мирных рыб минимизировать потери, связанные с нападением хищников [Радаков, 1972]. Самоорганизованное (в отсутствие явного лидера) поведение характерно не только для рыб. В птичьих стаях, например, поведение отдельных птиц в отсутствие явного лидера во многом зависит от поведения окружающих особей. При этом адаптивное поведение стаи как целого является результатом координации поведения этих особей, но не определяется простой суммацией образа действия отдельных птиц [Bahr, Bekoff, 1999].

Примечательно, что эмерджентность как проявление самоорганизации динамических процессов в сложных системах проявляется уже в простых математических моделях таких систем. В качестве примера рассмотрим кольцо из N связанных осцилляторов с периодическими граничными условиями [Rusakov et al., 2021]. Динамика такой системы может быть описана разностными уравнениями (отображениями):

$$x_{i}(t+1) = C\left(x_{k}'(t+1) + x_{m}'(t+1) - 2x_{i}'(t+1)\right) + x_{i}'(t+1),$$

$$i = 1, ..., N, \quad k = \begin{cases} i+1, & i < N, \\ 1, & i = N, \end{cases} \qquad m = \begin{cases} i-1, & i > 1, \\ N, & i = 1, \end{cases}$$
(1)

$$x'_{i}(t+1) = F(x_{i}(t)), \quad i = 1, ..., N,$$
 (2)

где i — номер осциллятора в кольце, t — время, C — константа. Первое слагаемое в правой части уравнения (1) описывает обменные процессы между отдельными осцилляторами кольца. Структура этой модели связанных между собой осцилляторов показана на рис. 1. Периодичность граничных условий в этой математической модели воспроизводит замкнутость реальных кольцеобразных экосистем (к примеру, прибрежных зон замкнутых водоемов: прудов, озер).



Рис. 1. Структура кольца осцилляторов [Rusakov et al., 2021]

Функция $F(x_i(t))$ в уравнении (2) описывает локальную динамику каждого из осцилляторов. В простейшем случае эта функция может быть задана в виде логистического отображения

$$x(t+1) = rx(t)(1 - x(t)),$$
(3)

где r — константа. Логистическое отображение широко используется при математическом моделировании популяционной динамики. Характер динамики, задаваемый логистическим отображением, существенно зависит от численного значения параметра r: при малых r x(t + 1) = x(t), а при увеличении численного значения этого параметра возникают регулярные колебания, которые в случае дальнейшего увеличения r трансформируются в хаотические осцилляции [Коt, 2001; Ризниченко, Рубин, 2004]. При этом существенный интерес представляет хаотическая динамика, поскольку именно хаос, как оказалось, присущ колебаниям обилия планктона в некоторых озерах [Medvinsky et al., 2015, 2017] (подробнее о динамическом хаосе в контексте функционирования биоценозов см. в разделе «Динамика популяций: пределы предсказуемости»).

В том случае, если в модели (1)–(2) принять одинаковые начальные условия для всех связанных осцилляторов, колебания в этих осцилляторах будут идентичны, и обмен между осцилляторами будет отсутствовать. В случае изменения значения x(t) в одном из осцилляторов характер колебаний может меняться за счет обменных процессов. Рис. 2 демонстрирует эффект небольшого возмущения ($\delta x = -0,1$), внесенного в динамику одного из изначально идентичных хаотических осцилляторов. А именно, возмущение δx вносится в восьмой осциллятор, запуская симметричные относительно восьмого осциллятора обменные процессы.

В этом случае (рис. 2) после внесения возмущения динамическая система осцилляторов распадается на два домена, отличающихся друг от друга характером колебаний. В одном из этих доменов, а именно при i = 1, 2, 3, 13, 14, 15, динамика осцилляторов остается хаотической (о чем свидетельствуют положительные значения доминантного показателя Ляпунова: +0,2 для i = 1, 15, +0,07 для i = 2, 14 и +0,02 для i = 3, 13), в то время как в другом домене хаотическая динамика после внесения возмущения трансформируется в регулярную. В результате формирования двух доменов, характеризующихся качественно разными типами колебаний, динамика системы связанных между собой осцилляторов как целого не может рассматриваться просто как результат простого суммирования локальных колебаний.

Естественно возникает вопрос о причине динамической неустойчивости такой системы осцилляторов после небольшого локального возмущения, приводящего к возникновению двух доменов, хотя и связанных между собой, но характеризующихся качественно разными типами динамики. Механизм этой трансформации становится понятным из рассмотрения рис. 3, где показаны спектры четырех последовательных осцилляторов (i = 1, 2, 3, 4), а также — спектры обменных процессов. Отметим, что спектры при i = 1, 2 и 3 соответствуют хаотическим колебаниям; они характеризуются набором тесно расположенных пиков, что характерно именно для хаотических колебаний [Kulp, Niskala, 2016]. Спектры при i = 4имеют вид, типичный для регулярных колебаний.



Рис. 2. Сегменты временных рядов (80 шагов во времени), которые формируются после внесения возмущения $\delta x = -0,1$ в динамику восьмого (i = 8) осциллятора при C = 0,075. До внесения возмущения все N (N = 15) хаотических осцилляторов (r = 3,88) демонстрировали синхронное поведение, в результате чего, как видно из уравнения (1), обменные процессы отсутствовали. На данном рисунке временной ряд при i = 1 идентичен временному ряду при i = 15, временной ряд при i = 2 идентичен временному ряду при i = 15, временной ряд при i = 2 идентичен временному ряду при i = 14 и т. д. Такая симметрия обусловлена как периодическими граничными условиями в кольце, так и местом внесения возмущения [Rusakov et al., 2021]



Рис. 3. (а) Спектры временных рядов осцилляторов при i = 1, 2, 3 и 4. (б) Спектры соответствующих обменных процессов [Rusakov et al., 2021]

Итак, рис. 3 демонстрирует сходство спектров колебаний осцилляторов и спектров обменных процессов между соответствующими осцилляторами. Такое сходство предполагает тесную взаимозависимость между вариациями обменных процессов и колебаниями взаимосвязанных осцилляторов. Если, как в данном случае, интенсивность обменных процессов, задаваемая константой *C* в уравнении (1), превышает критическую, то резонанс, т. е. совпадение компонент спектров обменных процессов с компонентами спектров изначально хаотических колебаний из изначально непрерывных спектров, характерных для хаоса. Результатом такой селекции является трансформация хаотических колебаний в регулярные. Эмерджентность в данном случае обусловливается нелинейным взаимодействием между осцилляторами и проявляется как несводимость возникновения двух динамически различных доменов к простой сумме колебаний отдельных осцилляторов.

Эмерджентность свойственна не только отдельным популяциям, но также и биоценозам. Понятие биоценоза предполагает не просто совокупность популяций, населяющих конкретный участок суши или водоема и принадлежащих разным видам. Это понятие включает в себя также взаимодействие между популяциями биоценоза, а кроме того — взаимодействие этих популяций с факторами окружающей среды. Такие взаимодействия обусловливают эмерджентность биоценоза как целостной системы. В существенно редуцированном виде эмерджентность, свойственная биоценозу, часто рассматривается на примере взаимодействия популяций жертвы (или некоторого другого ресурса) и популяций хищника/потребителя. При этом было показано как экспериментально [Urabe, Sterner, 1996; Sterner et al., 1998; Nelson et al., 2001; Urabe et al., 2002, 2003], так и теоретически [Andersen, 1997; Loladze et al., 2000; Muller et al., 2001], что вариации химического состава (т. е. стехиометрические показатели) жертвы могут существенно влиять на динамику системы «хищник-жертва». В общем случае экологическая стехиометрия включает в себя анализ биологических и экологических систем, начиная с исследований роста клеток, белкового синтеза, метаболизма, реакций генома при вариациях концентраций фосфора и азота и заканчивая биогеохимическими взаимодействиями как в отдельных биоценозах, так и в масштабах всей планеты [Hessen et al., 2013].

В качестве примера, иллюстрирующего эффективность использования принципов стехиометрии для демонстрации эмерджентности экологических систем, остановимся на некоторых результатах, представленных в работе [Loladze et al., 2004], где исследуется динамика сравнительно простой модельной экосистемы, включающей две популяции потребителей (y_1 и y_2) и одну популяцию жертвы (x). Стехиометрические показатели в рамках этой модели удовлетворяют следующим предположениям:

- (1) на систему оказывают влияние только два химических элемента, а именно — фосфор (Р) и углерод (С);
- (2) отношение P:C в популяции жертвы x варьирует, но никогда не опускается ниже некоторого минимума (q);
- (3) отношение Р:С в популяциях потребителей y₁ и y₂ поддерживается постоянным и принимает значения, соответственно, s₁ и s₂;
- (4) фосфор разделен на два пула: в популяциях потребителей и потенциально доступный для жертв;
- (5) суммарная концентрация фосфора (P_T) не изменяется.

Математическое описание модели имеет следующий вид:

$$\frac{dx}{dt} = rx \left(1 - \frac{x}{\min(K, P_T - s_1 y_1 - s_2 y_2)/q} \right) - f_1(x)y_1 - f_2(x)y_2,$$
(4a)

$$\frac{dy_1}{dt} = e_1 \min\left(1, \frac{(P_T - s_1 y_1 - s_2 y_2)/x}{s_1}\right) f_1(x) y_1 - d_1 y_1,$$
(46)

$$\frac{dy_2}{dt} = e_2 \min\left(1, \frac{(P_T - s_1 y_1 - s_2 y_2)/x}{s_2}\right) f_2(x) y_2 - d_2 y_2.$$
 (4B)
В уравнениях (4) r, K, e_1 , e_2 , d_1 , d_2 — константы, а $f_1(x)$ и $f_2(x)$ — функции Холлинга II типа:

$$f_i = \frac{c_i x}{a_i + x}, \quad i = 1, 2.$$

Было показано, что учет стехиометрических показателей взаимодействий в системе, описываемой моделью (4), выявляет эмерджентную особенность такой системы как целого: возможность устойчивого сосуществования популяций в этой системе, включающей две популяции потребителей, конкурирующих за один и тот же ресурс, и одну популяцию жертвы. Этот вывод немаловажен для понимания механизмов, лежащих в основе поддержания природного биоразнообразия.

Отметим, что межпопуляционные взаимодействия в биоценозе и взаимодействия особей внутри отдельной популяции часто взаимосвязаны. Так, например, в системе «хищник-жертва» взаимная интерференция хищников, т. е. подавление хищничества при высокой плотности популяции хищника, может существенно изменить характер динамики такой системы как целого [Arditi, Ginzburg, 2012]. Эмерджентность системы взаимодействующих популяций не позволяет достичь прогресса в понимании механизмов, лежащих в основе (зачастую нерегулярных) колебаний популяционного обилия, предполагая отдельную популяцию изолированной [Forbes, 1887]. В то же время холистический подход к исследованию биоценозов затрудняется тем обстоятельством, что многие биоценозы имеют сложную структуру.

2. Структурная сложность популяционных систем

Некоторое представление о структурной сложности природных популяционных систем можно получить из рис. 4, где представлена (упрощенная) схема трофических взаимодействий в одном из прибрежных районов Атлантического океана. Понятно, что исследование механизмов, которые обусловливают характер и предсказуемость динамики популяций, вовлеченных в сложную сеть трофических взаимодействий (подобную той, что показана на рис. 4) и к тому же подверженных воздействию экзогенных факторов, практически невозможно без редукции исходной природной структуры как межпопуляционных взаимодействий, так и редукции структуры внешних воздействий на исследуемую экосистему. Острота проблемы, связанной с необходимостью совмещения редукционистского подхода с полнотой описания популяционной динамики, при этом очевидна.

Отметим, что сложность структуры популяционных систем (см. рис. 4) не исключает возможность блочного характера таких структур. Иными словами,



Рис. 4. Упрощенная структура трофических взаимодействий между популяциями в северо-западной части Атлантического океана. Здесь учтены не все детали таких взаимодействий. Кроме того, часть видов, представленных в этой структуре, не обитают постоянно в этой части Атлантики (https://ru.scribd.com/document/78539365/Northwest-Atlantic-Partial-Food-Web)



Рис. 5. Трофическая сеть экосистемы Бенгелы [Yodzis, 2000]

может оказаться, что существенными для динамики некоторой популяции оказываются не все, а только некоторые, сравнительно немногочисленные, трофические связи. Такая возможность существенно упростила бы исследование популяционных систем. Однако выявление блочного характера структуры таких систем является непростой задачей.

В качестве примера рассмотрим математическую модель, предложенную с целью изучения прибрежной экосистемы Бенгелы (Ангола). Изучение этой экосистемы во многом инициируется практическими соображениями. Дело в том, что воды Атлантического океана в этом месте характеризуются апвеллингом, т. е. подъемом богатой биогенами воды из глубин океана к поверхности, в результате чего создаются условия, благоприятные для рыбных популяций, а следовательно — и для рыболовецкого промысла и для индустрии, связанной с переработкой рыбы.

Схема трофических взаимодействий между популяциями экосистемы Бенгелы представлена на рис. 5. Математическая модель, описывающая эти взаимодействия, имеет следующий вид [Yodzis, 2000]:

$$\frac{dB_i}{dt} = r_i B_i \left(1 - \frac{B_i}{K} \right) - \sum_k F_{ik} B_k - H_i,$$
(5)

$$\frac{dB_i}{dt} = \left(-T_i + \sum_k (1 - \delta_k)F_{ki}\right)B_i - \sum_k F_{ik}B_k - I_iB_i^2 - H_i.$$
(6)

В уравнениях (5) и (6) t — время, i и k ($i \neq k$) — номера, присвоенные популяциям, включенным в трофическую цепь, показанную на рис. 5, B_i в уравнении (5) — биомасса популяции, играющей в ходе трофических взаимодействий (рис. 5) роль «жертвы», а B_i в уравнении (6) — биомасса популяции, играющей в ходе трофических взаимодействий (рис. 5) обе роли: и «жертвы», и «хищни-ка» (более подробное описание модели (5)–(6) и ее обоснования см. непосредственно в статье [Yodzis, 2000]).

С учетом сложного характера трофических взаимодействий, представленных на рис. 5, результаты вычислений с использованием модели (5)–(6) с трудом поддаются интерпретации. В связи с этим автором был предложен ряд положений, упрощающих анализ [Yodzis, 2000]:

(1) экосистема пространственно однородна и находится в равновесии;

(2) отклонения от равновесия малы, в результате чего можно использовать методы линеаризации модели (5)–(6).

В результате было показано, что в случае блочного характера взаимодействий между гидробионтами экосистемы Бенгелы только некоторые виды, такие как: ставрида, скумбрия, тунец, снэк, киты, дельфины, акулы, хамса, кальмары, капский лосось, — могут влиять на динамику системы в целом. Однако если трофические взаимодействия не носят блочный характер, то взаимодействие всего лишь между двумя популяциями: тюленя и хека — могут обусловливать существенные изменения в характере колебаний и предсказуемости популяционного обилия в этой экосистеме. Для того, чтобы получить ответ на вопрос: «Какой тип взаимодействия присущ некоторой конкретной экосистеме?» — требуется тщательный анализ межпопуляционных взаимодействий. Практически такой анализ сталкивается с многочисленными трудностями. Поэтому попытки искусственной регуляции продуктивности подобной сложно организованной системы требуют сугубой осторожности.

Здесь необходимо отметить, что даже при блочном характере взаимодействий между популяциями использование методов математического моделирования популяционной динамики сталкивается со значительными трудностями при анализе и оценках предсказуемости колебаний численности популяций. В качестве примера рассмотрим математическую модель выделенного блока популяций гидробионтов, включающего зоопланктон, мирную и хищную рыбу [Медвинский и др., 2019]. Соответствующие трофические связи, учитывающие внутреннюю размерно-возрастную структуру этих популяций, показаны на рис. 6.

Из рис. 6 видно, что популяция зоопланктона представлена двумя возрастными когортами, популяция рыбы-планктонофага — тремя возрастными когортами, а популяция хищника — четырьмя.

Популяция зоопланктона (рис. 6) представлена пополнением и взрослым зоопланктоном. Динамика ювенильной группы зоопланктона определяется скоростью размножения взрослых зоопланктеров, естественной смертностью (без учета хищничества) и смертностью в результате выедания зоопланктона личинками мирной и хищной рыбы. Динамика взрослой когорты зоопланктона определяется выеданием зоопланктона хищной и мирной рыбой второй возрастной когорты и естественной смертностью.

Популяция мирной рыбы N_1 (рис. 6) состоит из трех групп особей, различающихся по массе. Помимо процессов воспроизводства данная модель описывает динамику численности и изменения средней массы в каждой из упомянутых выше групп. Переход из одной группы в другую происходит при достижении порогового значения массы тела.

Динамика численности неполовозрелых когорт мирной рыбы определяется естественной гибелью и хищничеством со стороны третьей когорты хищной рыбы (перешедшей на хищничество, но пока не способной к размножению), а также переходом из одной когорты в другую по достижению пороговой массы тела. Пополнение первой стадийной группы составляет молодь, выжившая в процессе созревания икры, а второй группы — особи из первой группы, достигшие порогового значения массы тела.



Рис. 6. Трофические взаимоотношения, с учетом жизненных циклов гидробионтов [Медвинский и др., 2019]: N_i^k — численность мирной (i = 1) и хищной (i = 2) рыбы на k-й стадии жизненного цикла; ω_i^k — средняя масса мирной (i = 1) и хищной (i = 2) рыбы на k-й стадии жизненного цикла; ω_{crij}^k — пороговое значение массы при переходе из одной стадии жизненного цикла в другую; п.с.с. — переход в следующую стадию

Молодь хищной рыбы (группы N_2^1 и N_2^2) до достижения рыбой пороговой массы питается, как и мирная рыба, зоопланктоном (рис. 6). Переход к хищничеству обусловливается увеличением потребности в энергии с ростом подвижности и массы тела [Mittelbach et al., 1988]. Описание динамики хищной рыбы в группах N_2^1 и N_2^2 схоже с описанием динамики численности молоди мирной

рыбы (группы N_1^1 и N_1^2), но есть и отличие: убыль популяции хищной рыбы происходит только за счет естественной смертности.

После перехода на хищничество (стадия N_2^3) пищевым ресурсом хищников становится молодь мирной рыбы (группы N_1^1 и N_1^2 ; рис. 6). Особи, достигшие половозрелого возраста (стадия N_1^3 мирной рыбы и стадия N_2^4 хищника; см. рис. 6), прекращают потребление и влияют на динамику численности популяций только путем воспроизводства.

Представленная выше математическая модель блока популяций гидробионтов, включающего зоопланктон, мирную и хищную рыбу (рис. 6), включает в себя довольно большое число параметров. Оценка их численных значений и анализ решений модели при изменении значений параметров является непростой задачей. Обычно такая параметризация проводится с учетом результатов измерений, проводившихся не на одном, а на целом ряде водоемов в очень разных условиях. В результате оказывается практически невозможным (даже при блочном характере взаимодействий между популяциями) применять результаты математического моделирования к какой-либо конкретной экосистеме.

С целью выхода из такой ситуации часто осуществляют существенную редукцию описаний популяционной динамики в рамках сравнительно простых (концептуальных) математических моделей, в которых и число уравнений, и число параметров невелико. Такая редукция, казалось бы, должна облегчить как интерпретацию получаемых результатов, так и привязку этих результатов к данным, получаемым в ходе экспериментов и/или мониторинга природных экосистем. Так ли это?

Рассмотрим конкретный пример математической модели системы «фитофаг-энтомофаг» [Базыкин и др., 1993]:

$$\frac{du}{dt} = u(u-l)(1-u) - uv + \alpha, \tag{7}$$

$$\frac{dv}{dt} - \gamma v(m - u + \beta v). \tag{8}$$

В уравнениях (7)–(8) *и* и *v* — размеры популяций фитофага и энтомофага соответственно; α , β , γ , l, m — параметры модели; их биологический смысл таков: l < 1 — отношение нижней критической плотности популяции фитофага к плотности, обусловленной ресурсами этой популяции в отсутствие энтомофага; $m\gamma$ — мальтузианский параметр, причем γ — это коэффициент переработки биомассы фитофагов в биомассу энтомофагов; α — скорость миграционного потока насекомых; β — параметр, характеризующий конкуренцию между энтомофагами.

Параметрический портрет модели (7)–(8) в виде среза на плоскость (m, β) представлен на рис. 7. Портрет содержит 21 область. Эти области характеризуются разным характером динамики, при этом некоторые из фазовых траекторий оказываются топологически тождественными. Так что в результате параметрический портрет обладает определенной симметрией [Базыкин, 2001].



Рис. 7. Параметрический портрет модели (7)-(8) [Базыкин и др., 1993]

Фазовые траектории, соответствующие решениям модели (7)–(8) на сечении пространства параметров плоскостью (m, β), показаны на рис. 8 и 9. В частности, рис. 8 демонстрирует стереотипы модельной динамики, т. е. те динамические режимы, которым могут быть поставлены в соответствие данные, полученные в ходе наблюдений, за различными видами лесных насекомых [Исаев и др., 2001], а именно: устойчивое равновесие (рис. 8-1), автоколебания (рис. 8-2), вспышки массовых размножений (прочие фазовые портреты, представленные на рис. 8).

На рис. 9 показаны фазовые траектории, характеризующиеся зависимостью типа динамики от начальных условий. Такую зависимость часто рассматривают как проявление динамического хаоса [Воссага, 2004].

Однако в модели (7)–(8), представленной лишь двумя дифференциальными уравнениями, возникновение хаоса невозможно [Анищенко, 2008]. В данном случае зависимость от начальных условий отражает конкуренцию между сосуществующими нехаотическими притягивающими множествами (аттракторами).

Если такая конкуренция между динамическими режимами действительно имеет место в реальности, то предсказуемость изменения численности насекомых существенно ограничивается вероятностью переключений между сосуществующими аттракторами.



Рис. 8. Стереотипы динамики модели (7)–(8), нумерация которых соответствует областям параметрического пространства (рис. 7) [Базыкин и др., 1993]

Кроме того, идентификация конкретного динамического режима с использованием модели (7)–(8) требует сопоставления численных значений модельных параметров и результатов полевых измерений. При этом возникает вопрос: возможно ли в полевых условиях реализовать достаточно точные измерения численных значений таких модельных параметров, как: отношение нижней критической плотности популяции фитофага к плотности, обусловленной ресурсами этой популяции в отсутствие энтомофага (параметр *l* модели (7)–(8)), или численных значений мальтузианского параметра $m\gamma$, или параметра β , характеризующего конкуренцию между энтомофагами? Такое сопоставление модельных параметров и реальности представляется нам крайне маловероятным.

Данные, накопленные в ходе полевых измерений, представляют собой тот материал, на котором базируется математическое моделирование, а именно: выбор размерности той или иной модели, выбор функций, выбор параметров, а также — численных значений этих параметров. Такой выбор является проявлением редукционизма, неизбежно сопутствующего математическому моделированию. В то же время результаты полевых измерений: к примеру, временные



Рис. 9. Фазовые портреты модели (7)–(8), характеризующиеся наличием более одного притягивающего множества. Нумерация соответствует областям параметрического пространства на рис. 7 [Базыкин и др., 1993]

ряды, демонстрирующие динамику конкретных популяций, — являются продуктом взаимодействия множества биотических и абиотических процессов, влияющих на динамику данной популяции. В результате такой временной ряд отражает свойства исследуемой системы как целого (при этом он также несет в себе отпечаток процесса измерений; таким образом проявляется «эффект наблюдателя»). Указанное обстоятельство позволяет в некоторой мере снять «проклятие редукционизма» [Viceconti, 2015], сопутствующее математическому моделированию. С этой целью было предложено [Медвинский и др., 2019] использовать «гибридное моделирование динамики популяций». Гибридное моделирование предполагает прямое включение в математические модели временных рядов, полученных в ходе полевых измерений или экспериментов. На выходе появляется возможность численной оценки таких параметров, характеризующих изменения популяционного обилия во времени, которые трудно или даже невозможно измерить непосредственно в ходе наблюдений или экспериментов.

В качестве примера рассмотрим простейшую трофическую цепочку: фитопланктон (P, pecypc) – зоопланктон (Z, потребитель). Такая цепочка может описываться разностным уравнением:

$$P(t+1) - P(t) = G(c, P(t)) - f(m, P(t))Z(t).$$
(9)

В (9) t — время, G — функция, описывающая пополнение популяции фитопланктона (она может принимать как положительные, так и отрицательные значения), f — трофическая функция. Функция G зависит как от обилия популяции фитопланктона P, так и от большого числа параметров, влияющих на воспроизводство планктона; эти параметры задаются вектором c, размерность которого велика и заранее не определена. Трофическая функция f в (9) предполагается зависимой от P, а также — от параметров, число которых обычно не превышает 3 (см. табл. 1).

Если функция f определена, а временной ряд Z(t) получен на основании наблюдательных данных, то искомая функция G, которая непосредственно не измеряется в ходе полевых исследований, может быть получена из уравнения (9) в виде временного ряда. Таким образом может быть получена информация о динамике пополнения популяции фитопланктона. В работе [Медвинский и др., 2019] в качестве трофической функции f была использована функция Ивлева [Ивлев, 1955]:

$$f(\boldsymbol{m}, P(t)) = A\left(1 - e^{-\frac{P(t)}{b}}\right),$$

где m = (A, b), а функции P(t) и Z(t) задавались в виде временных рядов, полученных в ходе долговременного мониторинга экосистемы Нарочанских озер (Белоруссия). Примеры этих временных рядов показаны на рис. 10.

Принятие во внимание дополнительной информации, полученной в ходе полевых исследований (например, учет временных рядов, характеризующих

колебания концентрации биогенов), позволяет соотнести эту информацию с результатами математического моделирования. Такое соотнесение в случае модели (9) проявляется в виде корреляции спектров колебаний факторов окружающей среды: температуры и отношения концентраций растворенных в воде биогенов, азота и фосфора, — с полученными в результате моделирования спектрами колебаний пополнения популяций фитопланктона. Таким образом, в частности, была продемонстрирована сопряженность колебаний функции G(t)и температуры [Медвинский и др., 2019].

Таблица 1. Примеры вида трофической функции *f*(*N*, *P*) [Turchin, 2003; Тютюнов, Титова, 2018]

Название функции	Вид зависимости	
Постоянная	С	
Линейная	aN	
Гиперболическая	aN/(1 + ahN)	
Экспоненциальная (Ивлева)	$R(1 - \exp(-N/a))$	
То же, но $g(N) \rightarrow g(N/P)$	$R(1 - \exp(-bN/P))$	
Сигмоидная № 1	$cN^2/(d^2+N^2)$	
Сигмоидная № 2	$kN^2/(1+gN+khN^2)$	
θ-сигмоидная	$cN^{ heta}/(d^{ heta}+N^{ heta})$	
Механистическая интерференция	aN/(1 + awP)	
Линейная интерференция	cN/P	
Хассела – Варли (Hassell – Varley)	cN/P^m	
Хассела – Варли – Холлинга (Hassell – Varley –	$c(N/D^m)/(1 + aw(N/D^m))$	
Holling)	C(1V/1)/(1+UW(1V/1))	
Беддингтона – ДеАнжелиса (Beddington –	aN/(1 + awP + ahN)	
DeAngelis)	$u_{1}v_{1}(1 + u_{1}v_{1} + u_{1}v_{1})$	
Ардити – Гинзбурга (Arditi – Ginzburg)	$\min(aN/P, R)$	
Ардити – Гинзбурга – Контуа (Arditi –	a(N/P)/(1 + ah(N/P))	
Ginzburg – Contois)	u(1/1)/(1 + un(1/1))	
Базыкина – Кроули (Базыкина – Crowley)	$(aN/(1 + ahN))(1/(1 + \beta P))$	
Трана (Trân) № 1	$(N/P)(1-(1-\varepsilon\tau)^{P/\tau})$	
Трана (Trân) № 2	$(N/P)(1 - \exp(\varepsilon P))$	
Тютюнова № 1	$(aN)/((P/P_0) + \exp(-P/P_0) + ahN)$	
Тютюнова № 2	$(aN)/((P/P_0) + (1/(1 + P/P_0)) + ahN)$	

Представленная выше модель (9) описывает простую двухзвенную трофическую цепь типа «ресурс–потребитель». Усложнение гибридной модели может быть реализовано при условии, что имеется достаточно полная информация о трофических взаимодействиях и факторах, влияющих на динамику сообществ исследуемой экосистемы.



Рис. 10. Динамика планктонных популяций и колебания температуры в каждом из водоемов Нарочанской группы озер: (а) температура; (б) зоопланктон; (в) фитопланктон; (г) бактериопланктон (1 — малый плёс оз. Нарочь, 2 — большой плёс оз. Нарочь, 3 оз. Мястро, 4 — оз. Баторино); один шаг во времени (*t*) на представленных графиках соответствует одному месяцу реального времени [Медвинский и др., 2019]. Исходные данные, на основании которых построены показанные здесь временные ряды, представляют собой результаты мониторинга колебаний во времени температуры (°С), а также — вариаций обилия планктона: зоопланктона (г/м³) — с 1994 по 2013 г., фитопланктона (г/м³) — с 1993 по 2013 г. и бактериопланктона (10⁶ клеток/мл) — с 1995 по 2013 г. [Medvinsky et al., 2015, 2017; Тихонов, Медвинский, 2019]. Исходные данные приведены к нулевому среднему и единичной дисперсии

3. Динамика популяций: пределы предсказуемости

Оценка предсказуемости реальных, а не модельных, динамических процессов осложняется тем обстоятельством, что эти процессы во многих случаях отличаются нерегулярным характером изменений во времени (в качестве примера см. временные ряды, представленные на рис. 10). В идеале задача анализа временных рядов, полученных в ходе экспериментов и/или наблюдений, могла бы заключаться в построении компьютерной программы, использующей на входе исключительно результаты наблюдений (или экспериментов), представленных в виде временных рядов, а на выходе предлагающей математическую модель, которая бы описывала процессы, ответственные за наблюдаемую (и подающуюся на вход программы) динамику. По-видимому, отсутствуют фундаментальные запреты на реализацию такого подхода, но он чреват существенным недостатком: переменные полученной таким образом математической модели не обязательно могут соответствовать компонентам природных систем, идентифицируемым в ходе экспериментов или наблюдений [Kaplan, Glass, 1995]. На практике анализ временных рядов часто рассматривается как независимое исследование, позволяющее выявить ключевые особенности того или иного динамического процесса. Результаты подобного исследования в дальнейшем могут использоваться также и с целью построения математической модели процесса.

Одной их важных характеристик природных явлений, в том числе — популяционной динамики, является предсказуемость [Turchin, 2003]. Предположим, имеется последовательность измерений s_n , n = 1, 2, ..., N, и мы хотим предсказать такой результат последующего измерения $\overline{s_{N+1}}$, который минимизирует

ожидаемую величину квадрата ошибки предсказания $\left< \left(\overline{s_{N+1}} - s_{N+1}\right)^2 \right>$, где $\left< \dots \right>$

означает усреднение. Этот подход оправдан при исследованиях как гармонических осцилляций, также и линейных стохастических процессов [Kantz, Schreiber, 1997]. Однако вне линейной парадигмы, в рамках которой предполагается, что малые воздействия приводят к малым эффектам, оценки предсказуемости требуют привлечения методов нелинейной динамики.

На рубеже XIX и XX столетий Пуанкаре, анализируя при различных начальных условиях поведение системы трех гравитирующих тел (звезда плюс две планеты), показал, что динамика такой системы с трудом поддается предсказаниям [Poincaré, 1891]. В 1975 г. подобный характер динамического поведения получил название «хаос» [Li, Yorke, 1975]. Несмотря на то, что, уже начиная с 20-х годов XX века, исследования, посвящённые хаотической динамике, получили развитие в работах целого ряда математиков [Birkhoff, 1927; Cartwright, Littlewood, 1945; Колмогоров, 1954; Smale, 1967], возможность возникновения хаотических режимов в реальных процессах всерьез не рассматривалась до тех пор, пока Лоренц не продемонстрировал практическое приложение факта ограниченной предсказуемости решений математической модели климата [Lorenz, 1964]. Позднее Мэй [May, 1976, 1977] ввёл в активный оборот понятие хаоса при моделировании экологических процессов (см. также [Шапиро, Луппов, 1982]).

В теоретических концепциях хаос рассматривается как режим, проявляющийся в отсутствие каких бы то ни было внешних воздействий на исследуемую динамическую систему. Образом нелинейной динамической системы (не обязательно хаотической) может служить аттрактор: замкнутое множество *A*, для которого существует окрестность *B*, такая, что (см., например [Boccara, 2004]) $\lim_{t \to \infty} f^t(B) = A$, где f— отображение.

Под хаосом подразумевается нерегулярный колебательный процесс в нелинейных системах, характеризующийся экспоненциальной неустойчивостью. Мерой хаотичности такого процесса может являться доминантный показатель Ляпунова (Λ). А именно, поведение динамической системы является хаотическим, если $\Lambda > 0$ (см., например, [Лоскутов, 2010]). Для численной оценки Λ временного ряда, характеризующего поведение исследуемой динамической системы, этому временному ряду {X} = {X(1), ..., X(L)} ставится в соответствие вектор $\mathbf{X}(t) = [X(t), X(t - \tau), ..., X(t - (E - 1)\tau)]$ в *E*-мерном пространстве вложения. Затем для некоторого значения $t = t^*$ находятся $k(t^*)$ векторов $\mathbf{X}(t)$, попадающих в малую эвклидову ε -окрестность ($U(t^*)$) вектора $\mathbf{X}(t^*)$, после чего определяется среднее изменение нормы $\|\mathbf{X}(t^*) - \mathbf{X}(i)\|$ за время τ . Функция

$$S(\tau) = \frac{1}{M} \sum_{t}^{M} \ln\left(\frac{1}{k(t^*)} \sum_{i \in U} \left\|\mathbf{X}(t^* + \tau) - \mathbf{X}(i + \tau)\right\|\right),$$

где $M = t - (E - 1)\tau$, возрастает линейно до тех пор, пока норма разности между векторами $\mathbf{X}(t^* + \tau)$ и $\mathbf{X}(t + \tau)$ остается меньше размера хаотического аттрактора. Наклон линейного участка $S(\tau)$ позволяет (при удачном выборе параметров Eи ε ; подробности см. в [Kantz, Schreiber, 1997]) оценить величину доминантного показателя Ляпунова Λ . Необходимо отметить, что точность оценки Λ существенно зависит от длины временного ряда. Для коротких временных рядов часто не удается воспроизвести линейный участок функции $S(\tau)$, и это препятствует численной оценке величины Λ .

Тем не менее хаотические колебания были выявлены при анализе большого числа разнообразных математических моделей популяционной динамики. В качестве примеров укажем:

(1) хаос в логистическом разностном уравнении (3) [Мау, 1976];

(2) хаос в математической модели трехзвенной трофической цепи $x \to y \to z$ в виде системы трех дифференциальных уравнений [Hastings, Powell, 1991]:

$$\frac{dx}{dt} = x(1-x) - \frac{a_1 xy}{1+b_1 x},$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{a_1 xy}{1+b_1 x} - \frac{a_2 yz}{1+b_2 y} - d_1 y,$$

$$\frac{dz}{dt} = \frac{a_2 yz}{1+b_2 y} - d_2 z,$$

где a_i, b_i, d_i (j = 1, 2) — константы;

(3) «стехиометрический хаос» в модели (4) [Deng, Loladze, 2007].

Хаос был обнаружен также в лабораторных условиях: в отсутствие изменяющихся внешних условий или когда внешние воздействия направляются и/или контролируются в ходе лабораторных экспериментов. В частности, в таких экспериментах было продемонстрировано появление хаотических колебаний численности популяций в культурах мучных жуков [Constantino et al., 1997]; в сообществе, включающем два бактериальных штамма и популяцию питающихся бактериями инфузорий [Becks et al., 2005; Becks, Arndt, 2008], в сообществах бактерий и простейших, участвующих в процессах биологической нитрификации $NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ [Graham et al., 2007]; а также — в планктонных сообществах, воспроизводящих в лаборатории состав планктона, наблюдаемый в естественных условиях [Roelke et al., 2003; Telesh et al., 2019]. Лабораторные эксперименты, однако, еще не являются свидетельством распространенности хаотических режимов в естественных условиях.

В то время как длина временных рядов, генерируемых в ходе математического моделирования, в основном определяется самими исследователями в зависимости от решаемых ими задач и от инструментов, находящихся в их распоряжении (это в значительной степени относится и к лабораторным экспериментам), длина временных рядов, характеризующих колебания численности популяций в естественных условиях, существенно определяется периодичностью и длительностью полевых наблюдений, а они не в полной мере зависят от самого исследователя. Для анализа сравнительно коротких временных рядов был предложен метод [Turchin, 2003], в рамках которого полученный в ходе наблюдений временной ряд используется для реконструкции динамики за пределы того короткого интервала, в течение которого проводились наблюдения. С этой целью исследуемый динамический процесс u(t) представляется в виде функции $F(u(t-1), u(t-2), ..., u(t-p), \varepsilon(t))$, где t — время, ε — экзогенная переменная, описывающая воздействия (например, вариации температуры), не связанные непосредственно с внутрисистемными взаимодействиями, а *р* — временной лаг, за пределами которого угасает функциональная связь динамики с величистроится временной $u^{*}(t)$, $u^{*}(t) =$ ной *u*(*t*). Далее ряд такой что $=u^{*}(t-1)\exp[f(t)+\varepsilon(t)]$. При этом предполагается, что функция f(t), описывающая эндогенные процессы, задается полиномом $a_0 + a_1X + a_2Y + a_3X^2 + a_4Y^2 + a_5X^2 + a_4Y^2 + a_5X^2 + a_4Y^2 + a_5X^2 + a_5X^$ + a_5XY , где a_i (j = 1, 2, 3, 4, 5) — константы, $X = (u(t-1))^{\vartheta_1}$, а $Y = (u(t-2))^{\vartheta_2}$. Подбор численных значений параметров a_i и ϑ_i (i = 1, 2) производится таким образом, чтобы функция $u^*(t)$ максимально приближала функцию u(t). Если временной ряд $u^{*}(t)$ достаточно хорошо воспроизводит реальный динамический процесс, то этот ряд может быть продлен за пределы промежутка, в течение которого проводились наблюдения. С помощью такой реконструкции снимаются те ограничения на определение численного значения доминантного показателя Ляпунова, которые накладываются длиной временных рядов.

Метод реконструкции был использован для оценки численных значений Λ в приложении к реальным временным рядам, базирующимся на данных наблюдений над колебаниями обилия популяций различных животных [Turchin, 2003]. Для большинства таких временных рядов величина Λ оказывалась отрицательной, но и положительные ее значения были близки к 0, т. е. мало отличались от величины, разделяющей хаос и регулярную динамику. Этот факт явился одним из аргументов в пользу гипотезы о «жизни на краю хаоса» [Kauffman, 1993; Solé, Bascompte, 2006].

Таким образом, налицо расхождение между результатами математического моделирования, а также лабораторных экспериментов, свидетельствующих в пользу реальности хаотических колебаний популяционного обилия, и результатами математического анализа данных, полученных в ходе полевых измерений, свидетельствующих скорее в пользу экзотичности хаоса как динамического процесса, характеризующего функционирование природных популяций и их сообществ. В качестве объяснения такого расхождения рассматривалась структурная неустойчивость хаоса [Kaneko, Tsuda, 2000]. Такая структурная неустойчивость обусловливается наличием широких окон периодичности внутри хаотических областей бифуркационных диаграмм, характеризующих зависимость динамики популяций от некоторого бифуркационного параметра (например, скорости роста популяции). Поскольку в реальности условия обитания, а следовательно, и параметры, определяющие популяционную динамику, могут неконтролируемо изменяться во времени, даже сравнительно небольшие изменения бифуркационного параметра, связанные с вариациями условий обитания популяции, могут способствовать трансформации хаотических колебаний популяционного обилия в регулярные колебания. Кроме того, с помощью математического моделирования было продемонстрировано, что миграция рыбы между биотопами может приводить к дестабилизации как стационарных состояний, так и хаотических колебаний численности рыбы. В результате такой дестабилизации изменения размера рыбных популяций во времени приобретают регулярный или квазирегулярный характер [Medvinsky et al., 2015]. Вместе с тем идентификация хаотических колебаний планктонных популяций, не согласующихся с гипотезой о «жизни на краю хаоса» [Medvinsky et al., 2015], неизбежно ставит вопрос не только о распространенности хаоса в динамике популяций, но и об условиях возникновения, поддержания и функциональной значимости таких колебаний.

Хаотичность приводит к ограниченной предсказуемости соответствующего колебательного процесса некоторым горизонтом предсказуемости (T_{pr}) [Lighthill et al., 1986], т. е. длительностью временного интервала, в течение которого ма-

лое различие в начальных условиях (вызванное небольшим возмущением модельной фазовой траектории или погрешностью измерений в случае реальных экспериментов/наблюдений) возрастает настолько, что корреляция между прогнозом и экспериментом/наблюдением уменьшается практически до нуля. Горизонт предсказуемости ($T_{\rm pr}$) становится меньше, и, соответственно, предсказуемость процесса падает при увеличении хаотичности поведения динамической системы [Boffetta et al., 2002]:

$$T_{\rm pr} \approx \Lambda^{-1}$$
. (10)

Однако следует принимать во внимание, что взаимозависимость Λ и $T_{\rm pr}$, задаваемая соотношением (10), в некоторых случаях может нарушаться. К таким случаям относятся:

- (1) сосуществование и конкуренция нескольких аттракторов. Если бассейны притяжения к каждому из конкурирующих аттракторов имеют сложную структуру, уже небольшой внешний шум способен заставить систему постоянно дрейфовать, перемещаясь из бассейна в бассейн. Динамика при этом становится практически непредсказуемой, невзирая на динамические свойства: хаотичность или регулярность, — каждого из конкурирующих аттракторов [Medvinsky et al., 2001; Медвинский и др., 2002; Братусь и др., 2010];
- (2) хорошо предсказуемый хаос, для которого (в отсутствие внешних воздействий) доминантный показатель Ляпунова А является конечной и положительной величиной, однако T_{pr} → ∞. Хорошо предсказуемый хаос реализуется тогда, когда вариации максимальных и минимальных значений хаотических колебаний существенно меньше разницы между этими максимальными и минимальными значениями [Medvinsky, Rusakov, 2011].

Несколько иной алгоритм оценки горизонта предсказуемости, не связанный непосредственно с соотношением (10), предлагается в [Kaplan, Glass, 1995]. Этот алгоритм, который делает возможным сравнение участков временных рядов, соответствующих наблюдаемым колебаниям, с прогнозом, содержит следующие этапы:

(1) построение вектора

$$\vec{N}_{T/2} = (N_{T/2}, N_{(T/2)-1}, N_{(T/2)-2}, ..., N_{(T/2)-(d-1)}),$$

где d — размерность пространства вложения [Kaplan, Grass, 1995]; (2) поиск на интервале [0, T/2] вектора

$$\vec{P}_{t_i} = (P_{t_i}, P_{t_i-1}, P_{t_i-2}, ..., P_{t_i-(d-1)}), \quad i = 1, 2, ..., m,$$

такого, что

$$\left|\vec{N}_{T/2}-\vec{P}_{t_i}\right| < \varepsilon \ll 1;$$

(3) предсказание значения на один шаг вперед во времени:

$$N'_{(T/2)+1} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^{m} P_{t_i+1};$$

- (4) построение вектора $N'_{(T/2)+1}$ в соответствии с пунктом (1), используя предсказанное значение $N'_{(T/2)+1}$ в качестве уже известного;
- (5) следующая итерация на интервале [0, *T*/2+1], и так далее вплоть до достижения предсказания в точке *T*;
- (6) расчет ошибки предсказания на *n*-й итерации [Medvinsky, Rusakov, 2011]

$$E(n) = \frac{1}{n} \sum_{t=T/2+2}^{T/2+n} \left| \frac{N_t' - N_{t-1}'}{N_t - N_{t-1}} - 1 \right|;$$
(11)

(7) оценка горизонта предсказуемости (T_{pr}). Для количественной оценки T_{pr} устанавливается предельное значение ошибки предсказания $E_L \ll 1$.

Из (11) видно, что чем ближе предсказанное значение N' к реальной величине N, тем меньше ошибка предсказания. Численное значение горизонта предсказуемости $T_{\rm pr}$ при этом возрастает, т. е. динамика становится более предсказуемой при уменьшении численного значения E(n). Пример предсказания хаотического временного ряда с использованием приведенного выше алгоритма показан на рис. 11.

Отметим, что точность предсказания существенно зависит от числа зарегистрированных колебаний, предваряющих процесс предсказания. Это обстоятельство существенно ограничивает применимость приведенного выше алгоритма к реальным популяционным процессам в связи с тем, что длина соответствующих временных рядов, полученных в ходе полевых наблюдений, часто оказывается недостаточной для релевантной оценки горизонта предсказуемости этих процессов.

Интересно, что горизонт предсказуемости может зависеть от временного масштаба. В работе [Medvinsky et al., 2013] было продемонстрировано, что интервалы времени, характеризующиеся хаотичностью колебаний популяционного обилия, могут периодически воспроизводиться. В результате, в то время как на сравнительно небольших временных интервалах динамика популяции является хаотической и, следовательно, ее предсказуемость ограничена величиной $T_{\rm pr}$, на больших временных масштабах, характерных для воспроизводства хаоса, такая динамика проявляет регулярность, свойственную периодическим процессам.



Рис. 11. (а) Участок хаотического временного ряда N(t). Предсказанные значения отмечены светлыми кружками, а реальные — темными ромбами. (б) Ошибка предсказания E(t), вычисленная по формуле (11). Вертикальная пунктирная линия обозначает момент начала предсказания. В данном случае оценка величины $T_{\rm pr}$ проведена, исходя из значения $E_L = 0,1$, что соответствует горизонту предсказуемости, равному четырем временным шагам [Medvinsky, Rusakov, 2011]

Еще один подход к анализу временных рядов и, в частности, оценке их предсказуемости: численный рекуррентный анализ, — базируется на том, что динамическая система имеет возможность возвращаться, хотя и не точно, к своему начальному состоянию [Poincaré, 1891]. Повторяемость (рекуррентность) состояний динамической системы может быть представлена в виде рекуррентной матрицы

$$R_{ij}(\varepsilon) = H\left(\varepsilon - \|\mathbf{X}(i) - \mathbf{X}(j)\|\right); \quad i, j = 1, ..., N,$$
(12)

где **X**(*k*), *k* = *i*, *j*, — вектор, описывающий состояние исследуемой системы, *N* — число точек временного ряда, ε — малый параметр (феноменологические критерии выбора численного значения ε представлены в [Marwan et al., 2007]), *H* — функция Хевисайда (*H*(*x*) = 0 при *x* < 0, *H*(*x*) = 1 при *x* ≥ 0), $\|\cdot\|$ — эвклидова норма. Матрица (12) используется для визуализации рекуррентности в виде рекуррентных диаграмм. Рекуррентные диаграммы могут быть представлены

в виде набора точек в системе координат (i, j); черные точки при этом соответствуют значениям $R_{ij} = 1$, а белые — значениям $R_{ij} = 0$. Такие рекуррентные диаграммы симметричны относительно линии $R_{ii} = 1$. На рис. 12 показаны рекуррентные диаграммы, соответствующие разным динамическим режимам: периодическим колебаниям, хаотической динамике и случайному процессу.



Рис. 12. Рекуррентные диаграммы, соответствующие периодическому процессу (1), хаосу (2) и случайному процессу (3) [Бобырев и др., 2012]

Периодические колебания на рекуррентной диаграмме, как видно из рис. 12, предстают в образе периодических диагональных линий; хаотической динамике соответствуют апериодические структуры, а случайному процессу случайное распределение точек. В случае хаотической динамики сравнительно короткие диагональные отрезки длиной l, параллельные диагональной линии $R_{ii} = 1$, порождаются рекуррентностью фазовой траектории [Poincaré, 1891], так что в течение l моментов времени сегмент этой фазовой траектории оказывается практически параллельным другому близко расположенному к нему сегменту. Длина таких диагональных отрезков удовлетворяет следующему тождеству [Marwan et al., 2007]:

$$(1 - R_{i-1,j-1})(1 - R_{i+1,j+1})\prod_{k=0}^{l-1} R_{i+k,j+k} = 1,$$

где $R_{i-1,j-1} = 0$, если $R_{1,j} = 1$ или $R_{i,1} = 1$, и $R_{i+k,j+k} = 0$, если $R_{N,j} = 1$ или $R_{i,N} = 1$ [Medvinsky et al., 2015]. Горизонт предсказуемости в этом случае — это усредненная длина диагональных отрезков:

$$T_{\rm pr} = \frac{\sum_{l=l_{\rm min}}^{N} lP(l)}{\sum_{l=l_{\rm min}}^{N} P(l)},$$
(13)

где P(l) — это гистограмма распределения диагональных отрезков длиной l:

$$P(l) = \sum_{i,j=1}^{l} (1 - R_{i-1,j-1})(1 - R_{i+1,j+1}) \prod_{k=0}^{l-1} R_{i+k,j+k}; \quad i \neq j,$$

где l_{\min} — пороговое значение длины диагонального отрезка, позволяющее исключить из рассмотрения те короткие отрезки, которые соответствуют временным интервалам, в течение которых автокорреляция остается отличной от нуля.

Численный рекуррентный анализ хаотической планктонной динамики системы Нарочанских озер (см. рис. 10) позволил, в частности, используя (13), оценить величину $T_{\rm pr}$ для каждого из водоемов этой системы. На рис. 13 и 14 показаны рекуррентные диаграммы, восстановленные по временным рядам, характеризующим динамику популяций фитопланктона и бактериопланктона Нарочанских озер.



Рис. 13. Рекуррентные диаграммы, характеризующие динамику фитопланктона (см. рис. 10): (а) оз. Нарочь, малый плёс, (б) оз. Нарочь, большой плёс, (в) оз. Мястро, (г) оз. Баторино [Medvinsky et al., 2015]

Соответствующие численные значения горизонта предсказуемости $T_{\rm pr}$ динамики планктона приведены в табл. 2.

Таблица 2. Горизонт предсказуемости T_{pr} хаотических колебаний фитопланктона и бактериопланктона в Нарочанских озерах [Medvinsky, 2019]

Водоем	$T_{\rm pr}$, фитопланктон (мес.)	$T_{\rm pr}$, бактериопланктон (мес.)
Нарочь, малый плёс	2,4	4,8
Нарочь, большой плёс	2,3	4,6
Мястро	2,5	4,7
Баторино	2,5	3,4



Рис. 14. Рекуррентные диаграммы, характеризующие динамику бактериопланктона (см. рис. 10): (а) оз. Нарочь, малый плёс, (б) оз. Нарочь, большой плёс, (в) оз. Мястро, (г) оз. Баторино [Medvinsky et al., 2017]

Для временных рядов, полученных в ходе полевых исследований, величина $T_{\rm pr}$ зависит от множества эндогенных и экзогенных факторов, таких как: трофические взаимодействия между популяциями, колебания температуры и пр. Это означает, что величина горизонта предсказуемости колебаний численности конкретной популяции отражает не только динамические свойства самих популяционных колебаний, но выступает также в качестве характеристики особенностей исследуемой экосистемы во всей ее полноте. Поэтому численное значение горизонта предсказуемости может рассматриваться как холистический параметр.

4. Взаимосвязь между динамикой компонент биоценозов

Популяции, связанные трофическими взаимодействиями (например, в пределах одного блока трофических связей [Yodzis, 2000]) и объединенные сходными экзогенными влияниями, образуют динамическую систему. Ее образом является аттрактор: замкнутое множество A, для которого существует окрестность N, такая, что (см., например, [Boccara, 2004])

$$\lim_{t \to \infty} f^t(N) = A, \tag{14}$$

где f — отображение. Различные динамические процессы (например, колебания во времени численности отдельных популяций), принадлежа одному и тому же аттрактору, взаимосвязаны. В результате, к примеру, в системе «хищник–жертва» информация об изменениях численности популяции хищника позволяет, в принципе, судить о свойствах динамики популяции жертвы.

В качестве примера, следуя работе [Sugihara et al., 2012], рассмотрим в *E*-мерном фазовом пространстве траектории, притягивающиеся к *d*-мерному $(d \le E)$ аттрактору *A*. Для точки m(t), лежащей на одной из таких траекторий (t -время), выполняется условие

$$m(t+1) = f(m(t)).$$

При E = 3 точка m(t) может быть представлена следующим образом: m(t) = [X(t), Y(t), Z(t)]. Пусть X — наблюдаемый динамический процесс, один из тех, которые задают отображение f в E-мерном фазовом пространстве, а соответствующий временной ряд длины L: $\{X\} = \{X(1), ..., X(L)\}$. Задавая E-мерное пространство вложения, можно получить множество A_X точек x(t) с координатами $X(t), X(t - \tau), ..., X(t - (E - 1)\tau)$; здесь лаг $\tau > 0$. В общем случае точки x(t) на множестве A_X одно-однозначным образом связаны с точками m(t) на множестве A [Takens, 1981].

Если два процесса X и Y связаны между собой причинным образом (например, в рамках системы «хищник-жертва»), то, поскольку они имеют общий аттрактор A (14), появляется возможность провести реконструкцию ($\hat{Y}(t) | A_X$) временного ряда Y(t), используя для этого временной ряд X(t), и затем сравнить результат такой реконструкции с исходным временным рядом Y(t). Иными словами, характер динамики популяции жертвы может быть восстановлен на основе имеющейся информации (временного ряда) для популяции хищника (или наоборот). Алгоритм такой реконструкции состоит в следующем [Sugihara et al., 2012].

Рассматриваются два временных ряда: $\{X\} = \{X(1), ..., X(L)\}$ и $\{Y\} = \{Y(1), ..., Y(L)\}$. Для временного ряда $\{X\}$ находятся векторы $\vec{x}(t)$ с координатами $X(t), X(t - \tau), ..., X(t - (E - 1)\tau)$, которые формируют множество A_X . Затем находятся такие моменты времени $t_1, ..., t_{E+1}$, которые соответствуют векторам, отличающимся от каждого из векторов $\vec{x}(t)$ на величину, меньше пороговой; таким образом выявляются ближайшие соседи векторов $\vec{x}(t)$. Эти ближайшие соседи используются для идентификации предполагаемых ближайших соседей $Y(t_i), i = 1, ..., E + 1$, которые и используются для реконструкции:

$$\hat{Y}(t) \mid A_X = \sum w_i Y(t_i),$$

где

$$w_i = \frac{u_i}{\sum u_i}, \ u_i = \exp\left\{-\frac{d[x(t), x(t_i)]}{d[x(t), x(t_1)]}\right\},\$$

а $d[x(t), x(t_j)]$ суть эвклидово расстояние между соответствующими векторами. Аналогично проводится реконструкция временного ряда X(t) с использованием временного ряда Y(t). Если процессы X и Y взаимосвязаны, то при увеличении длины ряда L реконструкция $\hat{Y}(t) | A_X$ будет приближаться к Y(t), а реконструкция $\hat{X}(t) | A_Y - \kappa X(t)$. В результате реконструируемые и наблюдаемые временные ряды оказываются хорошо скоррелированными [Sugihara et al., 2012]. Тем самым может быть проверено наличие (или отсутствие) взаимосвязанности процессов X и Y.

Реконструкция временных рядов была проведена для анализа колебаний во времени вылова сардины и хамсы в Тихом океане (при этом предполагалось, что такие колебания отражают колебания численности популяций рыбы). Временные ряды, построенные по данным вылова, характеризовались двумя особенностями: во-первых, нерегулярностью колебаний и, во-вторых, — тем, что периоды максимальной численности сардины приходились на периоды падения численности хамсы. На основании этого факта были высказаны следующие предположения: (1) сардина и хамса являются конкурентами за общий ресурс [Murphy, Isaacs, 1964] или (2) сардина и хамса, хотя и совместно, но по-разному реагируют на изменения экзогенных факторов общей для сардины и хамсы среды обитания [Lasker, Mac Call, 1983]. В результате реконструкции временных рядов было продемонстрировано [Sugihara et al., 2012], что колебания числен-

ности популяций хамсы и сардины слабо коррелируют с соответствующими реконструируемыми временными рядами, а значит, не могут описываться в рамках представления об едином для этих колебаний аттракторе. Ответственными за наблюдаемый характер динамики рыбных популяций оказались экзо-генные факторы (в первую очередь — колебания температуры).

Еще одна возможность оценки взаимосвязанности экологических процессов в биоценозе заключается в вычислении индекса захвата фазы (phase locking index, PLI): [Kuramoto, 1984]:

$$PLI = \frac{1}{N} \left| \sum_{j=0}^{N-1} e^{-i\Delta\varphi(j)} \right|.$$
 (15)

В (15) N — число измерений (длина дискретного временного ряда); $\Delta \varphi$ — разница фаз исследуемых колебательных процессов; фаза φ является линейной функцией времени [Pikovsky et al., 2001]:

$$\varphi(j) = 2\pi \left(n + \frac{j - j_n}{j_{n+1} - j_n} \right), \quad j_n \le j \le j_{n+1},$$

где j_k (k = n, n + 1) — моменты времени (k — их последовательные номера), которые соответствуют одинаковым фазам (например — локальным максимумам временного ряда). Для строго синхронизованных временных рядов PLI = 1, а при полном отсутствии синхронизации PLI = 0. Разумеется, для большинства случаев, соответствующих реальной динамике, численные значения PLI лежат в промежутке между 0 и 1. Для проверки статистической значимости численных оценок степени фазовой синхронизации между временными рядами используется метод суррогатных данных [Kantz, Schreiber, 1997]. Численное значение PLI позволяет судить о степени фазовой синхронизации колебательных процессов [Kuramoto, 1984].

Поскольку температура, как оказалось, существенно влияет на динамику рыбных популяций (см. выше, и в работе [Sugihara et al., 2012]), естественно возник вопрос о влиянии температуры не только на рыбу, но и на динамику других гидробионтов. Численная оценка PLI сделала возможным обнаружение неоднозначного воздействия колебаний температуры на озерный планктон, а именно — на колебания численности планктонных популяций Нарочанских озер (рис. 10).

Рис. 15 демонстрирует численные значения PLI, а также распределения величины PLI для суррогатных данных, полученных с помощью случайного перемешивания исходных данных, полученных в ходе мониторинга колебания температуры и популяций фитопланктона (см. рис. 10).



Рис. 15. Численные значения PLI (показаны стрелками), характеризующие фазовую синхронизацию динамики фитопланктона и вариаций температуры. Показаны также распределения значений PLI для 1000 наборов суррогатных данных: (а) Малый плёс оз. Нарочь (PLI = 0,11), (б) Большой плёс оз. Нарочь (PLI = 0,13), (в) оз. Мястро (PLI = 0,23), (г) оз. Баторино (PLI = 0,44) [Medvinsky et al., 2017]

Из рис. 15 видно, что значения PLI для оз. Нарочь (a, δ) и оз. Мястро (b) лежат внутри распределений численных значений PLI, полученных для соответствующих суррогатных данных. Это означает, что динамика фитопланктона в этих водоемах не синхронизована с колебаниями температуры. Однако такая синхронизации имеет место в оз. Баторино (рис. 15, c). Отметим, что отсутствие синхронизации не обязательно предполагает отсутствие влияния температуры на динамику фитопланктона не является определяющим (помимо температуры на динамику фитопланктона могут влиять колебания концентрации биогенов, а также трофические взаимодействия между популяциями озерной экосистемы).

В отличие от фитопланктона, анализ данных полевых наблюдений показал, что для колебаний обилия бактериопланктона фазовая синхронизация с вариациями температуры характерна для всех озер Нарочанской группы. Выявленная таким образом неоднозначность влияния температуры на планктонную динамику может объясняться не столько прямым воздействием колебаний температуры на динамику планктонных популяций, сколько наличием или отсутствием взаимосвязанности колебаний обилия фитопланктона и динамики бактериопланктона (подробнее см. [Medvinsky et al., 2017]). Такая взаимосвязанность, в свою очередь, существенно определяется воздействиями со стороны других трофических уровней: обилия зоопланктона [Gulati, 1990; Perissinotto, 1992; Gurung et al., 2000] и концентрации биогенов в воде [Le et al., 1994; Vrede et al., 1999].

Приведенные выше примеры связей между компонентами экосистем, определенных в результате анализа данных полевых наблюдений, делают очевидной насущность выявления и анализа таких параметров, которые могут численно характеризовать как взаимодействие между биотическими факторами, так и степень влияния абиотических факторов на динамику популяций. Подобные параметры важны, поскольку их величина позволяет судить о механизмах как наблюдаемых колебаний популяционного обилия, так и пространственно-временных колебаний концентрации биогенов.

5. Заключительные комментарии

Эмерджентность, т. е. неаддитивность свойств сложной системы как целого, существенно влияет на гносеологию тех вопросов, которые формулируются исследователями в ходе анализа механизмов, определяющих динамические особенности функционирования сложных систем. Действительно, поскольку сложность, присущая многим природным экосистемам, предполагает несводимость свойств таких экосистем к сумме свойств их компонент, то, естественно, возникает вопрос о том, как связаны результаты исследований отдельных компонент такой экосистемы (например, в виде временных рядов) со свойствами экосистемы как целостного объекта. В некоторых случаях оказывается, что временные ряды, полученные в ходе полевых исследований, не принадлежат одному и тому же аттрактору, а потому могут рассматриваться как независимые компоненты экосистемы [Sugihara et al., 2012]. Подобная экосистема представляет собой сумму отдельных блоков (см. также [Yodzis, 2000]). В результате она проявляет себя как сравнительно простая, аддитивная система, что существенно упрощает анализ ее свойств. Другие, более сложно организованные экосистемы иногда можно характеризовать с помощью параметра, численное значение которого, с одной стороны, дает представление об экосистеме как целостном объекте, а с другой — позволяет связать величину этого холистического по своей природе параметра с взаимодействиями между компонентами экосистемы. Пример такого параметра — PLI. Этот параметр, с одной стороны, характеризует разную степень влияния колебаний температуры на хаотическую динамику фитопланктона и бактериопланктона в озерах, различающихся по морфометрическим и гидрологическими показателям, а с другой стороны дает возможность оценить воздействие отношения концентраций азота и фосфора в воде на процессы, обусловливающие взаимосвязанность колебаний обилия фитопланктона и динамики бактериопланктона [Medvinsky et al., 2017].

Еще один аспект сложности, присущей природным экосистемам, связан с оценками предсказуемости динамики популяций и абиотических факторов, влияющих на эту динамику. Результаты математического моделирования показывают, в частности, что в некоторых случаях предсказуемость может зависеть от того, на каком временном интервале проводится анализ временного ряда [Medvinsky et al., 2013]. Особый интерес могут представлять ситуации, когда реализуется конкуренция нескольких аттракторов. При фрактальной структуре бассейнов притяжения к каждому из аттракторов динамика такой система становится практически непредсказуемой [Medvinsky et al., 2001]. Реализуется ли такой сценарий в природных экосистемах, остается неясным.

Эти и множество других примеров, демонстрирующих различные подходы к проблемам, возникающим при анализе сложной популяционной динамики, заставляют внимательно относиться к содержательности вопросов, ответ на которые предполагается получить в ходе решения таких проблем. В связи с указанным обстоятельством может представлять интерес пример содержательных вопросов (подробнее см. [Kareva, 2019]), при ограничениях, которые накладываются в рамках использования метода скрытой основополагающей переменной [Karev, 2012], в ходе анализа математической модели:

$$\frac{dx_c}{dt} = rx\left(c - \frac{N(t)}{kz(t)}\right),$$
$$\frac{dz}{dt} = \gamma - \delta z(t) + e\frac{N(t)(1-c)}{z(t) + N(t)}$$

где x_c — субпопуляция потребителя, характеризующаяся параметром c, z — потребляемый ресурс, $N(t) = \sum_{\mathbb{A}} x_c(t)$ — общий размер популяции для всех значений параметра c, характеризующего потребление ресурса, r, k, γ, δ, e — константы.

Исследование популяционных процессов имеет своей предпосылкой тесное сотрудничество теоретиков и исследователей, проводящих полевые измерения. Такое сотрудничество предполагает, в частности, совместное участие соответствующих исследовательских групп и/или координацию их деятельности в ходе организации и проведения как мониторинга экосистем, так и математических

исследований с целью выявления и изучения факторов, существенно влияющих на предсказуемость и характер динамики природных популяций.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00381-21-00.

Литература

Анищенко В. С. Знакомство с нелинейной динамикой. — М.: URSS, 2008.

- Базыкин А. Д. Нелинейная динамика взаимодействующих популяций. М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2001.
- Базыкин А. Д., Березовская Ф. С., Исаев А. С., Хлебопрос Р. Г. Параметрическое обоснование принципа стабильности динамики системы «фитофаг–энтомофаг» // Доклады Академии наук. — 1993. — Т. 333. — С. 673–675.
- Бобырев А. Е., Бурменский В. А., Криксунов Е. А., Медвинский А. Б., Мельник М. М., Нуриева Н. И., Русаков А. В. Анализ колебаний численности популяций промысловых рыб Псковско-Чудского озера // Биофизика. — 2012. — Т. 57. — С. 140– 145.
- Братусь А. С., Новожилов А. С., Платонов А. П. Динамические системы и модели биологии. — М.: Физматлит, 2010.
- Ивлев В. С. Экспериментальная экология питания рыб. М.: Пищепромиздат, 1955.
- Исаев А. С., Хлебопрос Р. Г., Недорезов Л. В., Кондаков Ю. П., Киселёв В. В., Суховольский В. Г. Популяционная динамика лесных насекомых. М.: Наука, 2001.
- Колмогоров А. Н. О сохранении условнопериодических движений при малом изменении функции Гамильтона // Доклады АН СССР. — 1954. — Т. 98. — С. 527–530.
- Лоскутов А. Ю. Очарование хаоса // Успехи физических наук. 2010. Т. 180. С. 1305–1329.
- Медвинский А. Б., Адамович Б. В., Русаков А. В., Тихонов Д. А., Нуриева Н. И., Терешко В. М. Динамика популяций: математическое моделирование и реальность // Биофизика. — 2019. — Т. 64. — С. 1169–1192.
- Медвинский А. Б., Петровский С. В., Тихонова И. А., Тихонов Д. А., Ли Б.-Л., Вентурино Э., Мальхё Х., Иваницкий Г. Р. Формирование пространственно-временных структур, фракталы и хаос в концептуальных экологических моделях на примере динамики взаимодействующих популяций планктона и рыбы // Успехи физических наук. — 2002. — Т. 172. — С. 31–66.
- Радаков Д. В. Стайность рыб как экологическое явление. М.: Наука, 1972.
- Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Биофизическая динамика продукционных процессов. М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2004.
- Тихонов Д. А., Медвинский А. Б. Анализ временных корреляций между колебаниями обилия популяций планктона и корреляций между колебаниями планктонного обилия и вариациями температуры на примере экосистемы Нарочанских озер // Биофизика. — 2019. — Т. 64. — С. 747–753.

- Тютюнов Ю. В., Титова Л. И. От Лотки Вольтерра к Ардити Гинзбургу: 90 лет эволюции трофических функций // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79. — С. 428–448.
- Шапиро А. П., Луппов С. П. Рекуррентные уравнения в теории популяционной биологии. — М.: Наука, 1982.
- Andersen T. Pelagic Nutrient Cycles: Herbivores as Sources and Sinks. New York: Springer, 1997.
- Arditi R., Ginzburg L. R. How Species interact. Altering the Standard View on Trophic Ecology. — Oxford: Oxford University, 2012.
- Bahr D. B., Bekoff M. Predicting flock vigilance from simple passerine interactions: Modeling with cellular automata // Animal Behavior. — 1999. — Vol. 58. — P. 831–839.
- Becks L., Arndt H. Transitions from stable equilibria to chaos, and back, in an experimental food web // Ecology. — 2008. — Vol. 89. — P. 3222–3226.
- Becks L., Hilker F. M., Malchow H., Jürgens K., Arndt H. Experimental demonstration of chaos in a microbial food web // Nature. 2005. Vol. 435. P. 1226–1229.
- Birkhoff G. D. On the periodic motions of dynamical systems // Acta Mathematica. 1927. Vol. 50. P. 359–379.
- Boccara N. Modeling Complex Systems. New York: Springer, 2004.
- Boffetta G., Cencini M., Falcioni M., Vulpiani A. Predictability: a way to characterize complexity // Physics Reports. — 2002. — Vol. 356. — P. 367–474.
- Cartwright M. L., Littlewood J. E. On non linear differential equations of the second order: I. the equation $\ddot{y} - k(1-y^2)\dot{y} + y = b\lambda k\cos(\lambda I + \alpha)$, k large // Journal of London Mathematical Society. — 1945. — Vol. s1-20, I. 3. — P. 180–189.
- Constantino R. F., Desharnais R. A., Cushing J. M., Dennis B. Chaotic dynamics in an insect population // Science. — 1997. — Vol. 275. — P. 389–391.
- Deng B., Loladze I. Competitive coexisting in stoichiometric chaos // Chaos. 2007. Vol. 17. P. 033108 (14 pages).
- Forbes S. A. The lake as a microcosm // Bulletin of the Peoria Scientific Association. Peoria: Edward Hine & Co., 1887. — P. 77–87.
- Graham D. W., Knapp C. W., Van Vleck E. S., Bloor K., Lane T. B., Graham C. E. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification // The ISME Journal. 2007. Vol. 1. P. 385–393.
- Gulati R. D. Structural and grazing responses of zooplankton community to biomanipulation of some Dutch water bodies // Hydrobiologia. 1990. Vol. 200–201. P. 99–118.
- Gurung T. B., Nakanishi M., Urabe J. Seasonal and vertical difference in negative and positive effects of grazers on heterotrophic bacteria in Lake Biwa // Limnology and Oceanography. — 2000. — Vol. 45. — P. 1689–1696.
- Hastings A., Powell T. Chaos in a three-species food chain // Ecology. 1991. Vol. 72. P. 896–903.

- Hessen D. O., Elser J. J., Sterner R. W., Urabe J. Ecological stoichiometry: An elementary approach using basic principles // Limnology and Oceanography. 2013. Vol. 58. P. 2219–2236.
- Kaneko K., Tsuda I. Complex Systems: Chaos and Beyond. New York: Springer, 2000.
- Kantz H., Schreiber T. Nonlinear Time Series Analysis. Cambridge: Cambridge University, 1997.
- Kaplan D., Glass L. Understanding Nonlinear Dynamics. New York: Springer, 1995.
- Karev G. P. The HKV method of solving of replicator equations and models of biological populations and communities. 2012. [Электронный ресурс]. URL: https://arxiv.org/abs/1211.6596 (дата обращения: 16.03.2021).
- Kareva I. Combining bifurcation analysis and population heterogeneity to ask meaningful questions // Advanced Mathematical Methods in Biosciences and Applications / F. Berezovskaya, B. Toni (eds.). — Cham: Springer, 2019. — P. 89–108.
- Kauffman S. The origins of Order. Self-Organization and Selection in Evolution. Oxford: Oxford University, 1993.
- Kot M. Elements of Mathematical Ecology. Cambridge: Cambridge University, 2001.
- Kulp C. W., Niskala B. J. Characterization of time series data // Handbook of Applications of Chaos Theory / C. H. Skiadas, C. Skiadas (eds.). — Boca Raton: CRC, 2016. — P. 211– 230.
- Kuramoto Y. Chemical Oscillations, Waves, and Turbulence. Berlin: Springer, 1984.
- Lasker R., Mac Call A. New ideas on the fluctuations of the clupeoid stocks off California // Proceedings of the Joint Oceanographic Assembly 1982: General Symposia. — Ottawa: Canadian National Committee/Scientific Committee on Oceanic Research, 1983. — P. 110–120.
- Le J., Wehr J. D., Campbell L. Uncoupling of bacterioplankton and phytoplankton production in fresh waters is affected by inorganic nutrient limitation // Applied and Environmental Microbiology. — 1994. — Vol. 60. — P. 2086–2093.
- Li T.-Y., Yorke J. Period three implies chaos // The American Mathematical Monthly. 1975. Vol. 82. P. 985–992.
- Lighthill J., Thompson J. M. T., Sen A. K., Last A. G. M., Tritton D. T., Mathias P. The Recently Recognized Failure of Predictability in Newtonian Dynamics [and Discussion] // Proceedings of the Royal Society of London. — 1986. — Series A, Vol. 407. — P. 35–50.
- Loladze I., Kuang Y., Elser J. J. Stoichiometry in producer-grazer systems: Linking energy flow with element cycling // Bulletin of Math. Biol.. 2000. Vol. 62. P. 1137–1162.
- Loladze I., Kuang Y., Elser J. J., Fagan W. F. Competition and stoichiometry: coexistence of two predators on one prey // Theoretical Population Biology. — 2004. — Vol. 65. — P. 1–15.
- Lorenz E. N. The problem of deducing the climate from governing equations // Tellus. 1964. Vol. 16. P. 1–11.

- Marwan N., Romano M. C., Thiel M., Kurths J. Recurrence plots for the analysis of complex systems // Phys. Reports. 2007. Vol. 438. P. 237–329.
- May R. M. Simple mathematical models with very complicated dynamical behavior // Nature. — 1976. — Vol. 261. — P. 459–467.
- May R. M. Thresholds and breakpoints in ecosystems with a multiplicity of stable states // Nature. 1977. Vol. 269. P. 471–477.
- Medvinsky A. B. Recurrence as a basis for the assessment of predictability of the irregular population dynamics // Advanced Mathematical Methods in Biosciences and Applications / F. Berezovskaya, B. Toni (eds.). — Cham: Springer, 2019. — P. 131–145.
- Medvinsky A. B., Adamovich B. V., Aliev R. R., Chakraborty A., Lukyanova E. V., Mikheyeva T. M., Nikitina L. V., Nurieva N. I., Rusakov A. V., Zhukova T. V. Temperature as a factor affecting fluctuations and predictability of the abundance of lake bacterioplankton // Ecological Complexity. — 2017. — Vol. 32. — P. 90–98.
- Medvinsky A. B., Adamovich B. V., Chakraborty A., Lukyanova E. V., Mikheyeva T. M., Nurieva N. I., Radchikova N. P., Rusakov A. V., Zhukova T. V. Chaos far away from the edge of chaos: A recurrence quantification analysis of plankton time series // Ecological Complexity. — 2015a. — Vol. 23. — P. 61–67.
- Medvinsky A. B., Bobyrev A. E., Burmensky V. A., Kriksunov E. A., Nurieva N. I., Rusakov A. V. Modelling aquatic communities: Trophic interactions and the body-massand age-structure of fish populations give rise to long-period variations in fish population size // Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling. — 2015b. — Vol. 30. — P. 55–70.
- Medvinsky A. B., Rusakov A. V. Chaos and order in stateless societies: Intercommunity exchange as a factor impacting the population dynamical patterns // Chaos, Solitons & Fractals. — 2011. — Vol. 44. — P. 390–400.
- Medvinsky A. B., Rusakov A. V., Nurieva N. I. Integer-based modeling of population dynamics: Competition between attractors limit a predictability // Ecological Complexity. — 2013. — Vol. 14. — P. 108–116.
- Medvinsky A. B., Tikhonova I. A., Aliev R. R., Li B.-L., Lin Z.-S., Malchow H. Patchy environment as a factor of complex plankton dynamics // Phys. Rev. E. 2001. Vol. 64. — P. 021915 (7 pages).
- Mittelbach G. G., Osenberg C. W., Leibold M. A. Trophic relations and ontogenetic niche shifts in aquatic ecosystems // Size-structured Populations / B. Ebenman, L. Persson (eds.). — Berlin: Springer, 1988.
- Muller E. B., Nisbet R. M., Kooijman S. A. L. M., Elser J. J., McCauley E. Stoichiometric food quality and herbivore dynamics // Ecol. Lett. — 2001. — Vol. 4. — P. 519–529.
- Murphy G., Isaacs J. Species replacement in marine ecosystems with reference to the California current. (Manuscript report) // Minutes of Meeting of Marine Research Committee. — 1964. — Vol. 7. — P. 1–8.
- Nelson W. A., McCauley E., Wrona F. J. Multiple dynamics in a single predator-prey system: experimental effects of food quality // Proceedings of the Royal Society of London. 2001. Series B, Vol. 268. P. 1223–1230.

- Perissinotto R. Mezozooplankton size-selectivity and grazing impact on the phytoplankton community of the Prince Edward Archipelago (Southern Ocean) // Marine Ecology Progress Series. — 1992. — Vol. 79. — P. 243–258.
- Pikovsky A., Rosenblum M., Kurths J. Synchronization. A Universal Concept in Nonlinear Sciences. — Cambridge: Cambridge University, 2001.
- Poincaré H. Sur le problem des trois corps // Bulletin Astronomique. 1891. Vol. 8. P. 12–24.
- Roelke D., Augustine S., Buyukates Y. Fundamental predictability in multispecies competition: The influence of large disturbance // The American Naturalist. — 2003. — Vol. 162. — P. 615–623.
- Rusakov A. V., Tikhonov D. A., Nurieva N. I., Medvinsky A. B. Emergence of self-organized dynamical domains in a ring of coupled population oscillators // Mathematics. — 2021. — Vol. 9. — P. 601 (13 pages).
- Smale S. Differentiable dynamical systems // Bulletin of the American Mathematical Society. — 1967. — Vol. 73. — P. 747–817.
- Solé R. V., Bascompte J. Self-Organization in Complex Ecosystems. Princeton: Princeton University, 2006.
- Sterner R. W., Clasen J., Lampert W., Weisse T. Carbon:phosphorus stoichiometry and food chain production // Ecology Letters. — 1998. — Vol. 1. — P. 146–150.
- Sugihara G., May R., Ye H., Hsieh C., Deyle E., Fogarty M., Munch S. Detecting causality in complex ecosystems // Science. — 2012. — Vol. 338. — P. 496–500.
- Takens F. Dynamical systems and turbulence // Lecture Notes in Mathematics. 1981. Vol. 898. P. 366–381.
- Telesh I. V., Schubert H., Joehnk K. D., Heerkloss R., Schumann R., Feike M., Schoor A., Skarlato S. O. Chaos theory discloses triggers and drivers of plankton dynamics in stable environment // Scientific Reports. — 2019. — Vol. 9. — P. 20351 (13 pages).
- Turchin P. Complex Population Dynamics. A Theoretical/Empirical Synthesis. Princeton, Oxford: Princeton University, 2003.
- Urabe J., Elser J. J., Kyle M., Yoshida T., Sekino T., Kawabata Z. Herbivorous animals can mitigate unfavourable ratios of energy and material supplies by enhancing nutrient recycling // Ecol. Lett. — 2002. — Vol. 5. — P. 177–185.
- Urabe J., Sterner R. W. Regulation of herbivore growth by the balance of light and nutrients // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1996. Vol. 93. P. 8465–8469.
- Urabe J., Togari J., Elser J. J. Stoichiometric impacts of increased carbon dioxide on planktonic herbivores // Global Change Biol. — 2003. — Vol. 9. — P. 818–825.
- Viceconti M. Multiscale modeling of human pathophysiology // Biomechanics / M. Doblaré, J. Merodio (eds.). Singapore: Eolss Publishers, 2015. P. 413–435.
- Vrede K., Vrede T., Isaksson A., Karlsson A. Effects of nutrients (phosphorous, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton — a seasonal study // Limnology and Oceanography. — 1999. — Vol. 44. — P. 1616–1624.
- Yodzis P. Diffuse effects in food webs // Ecology. 2000. Vol. 81. P. 261-266.

Population dynamics: emergence, complexity, (not)predictability

A. B. Medvinsky, N. I. Nurieva, A. V. Rusakov

Institute of Theoretical & Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Moscow Region E-mail: alexander_medvinsky@yahoo.com

The complexity of population dynamics imposes significant limitations on the study of the mechanisms underlying this dynamics. We analyze the influence of the characteristic features that determine the complexity of dynamic processes on the mathematical modeling of specific ecosystems. We discuss ways to overcome a strictly reductionist approach to the study of complex systems.

Keywords: population dynamics, mathematical modeling, emergence, structure complexity of population systems, predictability of dynamic processes.

ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОФИЗИКИ (ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ФИТОПЛАНКТОНА)

С. И. Погосян¹

Актуальными проблемами экологии являются разработка методов более точного определения содержания фотосинтетических пигментов и связанная с ними оценка первичной продукции водных сред. Представлен разработанный на кафедре биофизики метод измерения в полости интегрирующей сферы (ICAM), который обеспечивает высокую чувствительность оценки содержания пигментов частиц фитопланктона и растворенного органического вещества без предварительной подготовки образцов природной воды. В качестве примера использования ICAM приведены результаты измерения спектров поглощения проб морской воды из Японского и Черного морей.

Разработан и испытан в экспедиционных условиях принципиально новый микрофлуориметр, позволяющий оценить состояние фотосинтетического аппарата индивидуальных клеток планктонных водорослей по параметрам флуоресценции хлорофилла. Микрофлуориметр позволяет оценить содержание фотосинтетических пигментов в клетках каждого вида водорослей в составе фитопланктонного сообщества, определить эффективность первичных процессов фотосинтеза каждой клетки и зависимость потока электронов через фотосистему II от интенсивности света (световую кривую фотосинтеза), которая является показателем продукции клетки, а также определять уровень нефотохимического тушения фотосинтетического аппарата клетки. Предел чувствительности данного микрофлуориметра 10⁻¹² г хлорофилла в объекте, что позволяет надежно измерят параметры флуоресценции хлорофилла одиночных клеток микрофитопланктона.

Ключевые слова: первичная продукция, хлорофилл, фитопланктон, абсорбционные методы, микрофлуориметрия, индивидуальные клетки.

Биофизика способна решать многие актуальные проблемы экологии. Внедрение ряда биофизических методов в системы экологического мониторинга представляется одной из актуальных задач современного этапа развития экологических исследований. В частности, представляется чрезвычайно важным усовершенствовать методы определения первичной продукции водных экосистем и определение вклада отдельных видов и таксонов фитопланктонного сообщества в суммарную продукцию водоема. Именно этим задачам посвящена данная статья.

¹ Биологический факультет МГУ, Москва, Россия.

E-mail: pogosyan@biophys.msu.ru
Используемая сейчас методология позволяет определить продукцию Мирового океана с точностью ± 40 %, что соответствует продукции Тихого океана. Такая точность оценки продукции Мирового океана, в основном, определяется тем, что наибольшая доля продукции сосредоточена на глубине нескольких десятков метров и может быть измерена только контактными методами. Биомасса в пересчете на углерод растительности суши до воздействия человека была 1150·10⁹ т и в настоящее время составляет 900·10⁹ т, а биомасса океана около 1,7·10⁹ т [Добровольский, 1998]. Синтез и разрушение органических веществ в океане существенно отличаются от этих процессов на суше. Масса фитопланктона почти на три порядка меньше массы наземных растений. Это обусловлено значительно более быстрыми жизненными циклами фитопланктонных организмов по сравнению с наземными растениями. Полная замена массы растительности суши происходит в среднем за 15 лет, а обновление всей биомассы фитопланктона океана — за 1 месяц. Органическое вещество, синтезированное фитопланктоном, практически полностью захватывается и разлагается в последующих трофических циклах. Таким образом, скорость обращения метаболитов фитопланктонного сообщества многократно превосходит этот показатель у наземных фитоценозов. Высокая скорость обращения органических соединений фитопланктонного сообщества предполагает возможность большой вариабельности скоростей первичной продукции в зависимости от условий среды. Разные условия инсоляции, температуры, минерального питания и других факторов среды приводят к изменениям первичной продукции, числа клеток фитопланктонного сообщества, его видового состава и состояния популяций каждого вида в сообществе. Эти процессы сопровождаются изменениями состояния фотосинтетического аппарата как индивидуальных видов водорослей, так и всего фитопланктонного сообщества в целом.

При распределении фитопланктона по глубине в водах разной трофности фотоактивный слой (слой воды, в котором процессы фотосинтеза превосходят процессы дыхания) олиготрофных зон океана может достигать 200-метровой глубины, тогда как для мезотрофных и тем более эвтрофных вод он ограничен десятками метров. Подводная облученность определяется падающим на поверхность воды солнечным излучением, которое ослабляется поглощением воды, растворенными в ней веществами, взвешенными частицами, молекулярным рассеянием и рассеянием света на частицах. Наиболее значимыми факторами, влияющими на ослабление интенсивности и спектрального состава света под водой, являются растворенное органическое вещество и взвешенное в воде вещество, включающее частицы фитопланктона. Максимум подводной облученности олиготрофных вод соответствует синей области спектра, около 480 нм, тогда как для эвтрофных вод достигает 560 нм (зеленая область спектра). В связи с этим цвет моря может значительно различаться. Он может быть синим в тропических зонах океанов, зеленым во внутренних морях и белесоватозеленым в прибрежных водах высоких широт [Шифрин, 1983].

Процессы фотосинтеза прежде всего зависят от интенсивности света на объекте. Зависимость скорости процесса фотосинтеза от интенсивности падающего света, называемая световой кривой фотосинтеза, имеет три участка. При низкой облученности скорость фотосинтеза прямо пропорциональна интенсивности света. Увеличение интенсивности света приводит к насыщению скорости фотосинтеза и ее выходу на постоянный уровень. Дальнейший рост интенсивности света может приводить к угнетению скорости фотосинтеза. Часто такое явление называют полуденным угнетением фотосинтеза. В крайних случаях интенсивная инсоляция приводит к необратимому повреждению фотосинтетического аппарата и фотодеструкции фотосинтетических пигментов растительных организмов [Suggett, 2010; Pogosyan, Matorin, 2005].

Традиционно принято определять первичную продукцию и видовой состав фитопланктона, а также его обилие по содержанию хлорофилла (ХЛ) а в определенном объеме воды. ХЛ а содержится во всех видах водорослей и цианобактерий в силу того, что он является конечным переносчиком энергии в системе пигментов фотосинтетического аппарата. Кроме того, ХЛ а включен в белокпигментные комплексы обеих фотосистем. Наиболее часто содержание ХЛ а определяют по спектрам поглощения ацетоновых или спиртовых экстрактов из клеток водорослей, предварительно осажденных на стекловолоконные фильтры при пропускании через них нескольких литров природной воды. Наиболее точное и полное определение состава и количества пигментов в экстракте из водорослей достигается при использовании методов HPLC-хроматографии (жидкостной хроматографии высокого разрешения) [Babin, 2002]. Определение первичной продукции, как правило, производится при помощи радиоактивного метода по скорости включения в клетки водорослей радиоактивного углерода (меченый бикарбонат натрия или калия). Этот метод трудоемок и требует больших затрат времени. Он имеет ряд принципиальных недостатков и множество источников методических ошибок [Кобленц-Мишке, Ведерников, 1977; Antoine et al., 1996]. Тем не менее именно этот метод наиболее широко используется для определения первичной продукции в водных экосистемах. Традиционное определение видового состава за последние десятилетия практически не претерпело каких-либо существенных изменений. Оно предполагает сгущение пробы природной воды путем фильтрации или осаждения, фиксацию полученного образца, определение видов водорослей в пробе и подсчет численности клеток каждого вида. Определение видового состава фитопланктона не поддается автоматизации. Это исследование весьма трудоемко и требует высокой квалификации от сотрудников, выполняющих данное определение. Биофизические методы позволяют определить ряд характеристик продукционного

процесса фитопланктона в природных водах с существенно меньшими затратами труда в режиме реального времени и, возможно, повысить точность определения первичной продукции вод.

Традиционные методы определения первичной продукции, применяемые в океанологии, не удовлетворяют современным требованиям из-за больших затрат ручного труда и времени на проведение измерений, а также из-за их недостаточной точности. Такое положение стимулирует разработку других, более точных методов определения первичной продукции. Расчет первичной продукции может быть основан на информации о пигментном составе фитопланктона, об интенсивности поглощенного им света и эффективности утилизации света в процессе фотосинтеза. Разрабатываемые методы определения показателей первичной продукции должны быть совместимы с данными спутникового мониторинга. Только использование данных дистанционного зондирования позволяет оценивать экологическое состояние больших акваторий. Данные спутникового зондирования, на основании которых получают информацию о продукционном процессе, могут быть значительно уточнены в тех случаях, когда в обследуемой акватории в ряде точек проведено контактное измерение содержания пигментов и продукции. Желательно, чтобы измерения в выбранных точках акватории были легко применимы к задачам коррекции спутниковых данных. Методам определения пигментного состава фитопланктона посвящено большое количество работ в последние три десятилетия. Это обусловлено необходимостью получения достоверной информации об одной из важнейших характеристик водной экосистемы. Одной из наиболее важных характеристик экологического состояния акватории является ее первичная продукция. Определение пигментного состава фитопланктона прямыми методами предполагает использование классической абсорбционной спектроскопии и/или HPLC-хроматографии экстрактов, получаемых из клеток фитопланктона, отделенного от воды на стекловолоконные фильтры. Детальное и исчерпывающее описание этого метода приведено в публикации [Погосян, Зайцева, 2015]. Эти аналитические методы обладают высокой точностью и достаточной чувствительностью. Они позволяют получать необходимые данные для определения качественного и количественного состава пигментов фитопланктона. Определение пигментного состава фитопланктона описанными методами позволяет оценивать вклад различных таксономических групп в составе фитопланктонного сообщества. Однако данные о составе пигментов фитопланктона не позволяют корректно определить спектральные характеристики заселенных фитопланктоном вод. Это обусловлено тем, что экстрагированные из фитопланктона пигменты имеют спектры поглощения, отличные от спектров поглощения этих же пигментов в составе фотосинтетического аппарата клеток фитопланктонных организмов. Кроме того, на спектры поглощения пигментов большое влияние может оказывать рассеяние

и эффект упаковки. Причем у разных организмов его вклад в деформацию спектров поглощения может значительно изменяться. Прямое определение пигментов, выделенных из клеток фитопланктона, требует выполнения большого объема лабораторных подготовительных работ и не позволяет использовать такую методику для получения результатов в режиме реального времени. Оптические методы определения in situ пигментного состава фитопланктона наиболее адекватны поставленным задачам. Распространение света в океанской воде сопровождается его поглощением и рассеянием. Эти свойства воды могут быть описаны тремя зависящими от длины волны коэффициентами: спектральными коэффициентами поглощения $a(\lambda)$, рассеяния $\sigma(\lambda)$ и индикатрисой рассеяния $\chi(\gamma)$. Спектральный коэффициент поглощения *a*(λ) может быть представлен в виде трех частей: $a(\lambda) = aw(\lambda) + as(\lambda) + ap(\lambda)$, где $aw(\lambda)$, $as(\lambda)$ и $ap(\lambda)$ являются спектральными коэффициентами поглощения воды, растворенными в ней компонентами и частицами взвеси соответственно [Шифрин, 1983]. Спектральный коэффициент поглощения частицами $ap(\lambda)$ доминирует в изменчивости $a(\lambda)$ в морских водах с небольшим влиянием берега. Таким образом, $ap(\lambda)$ является одним из наиболее важных параметров, которые должны быть известны для полного описания оптических свойств водных систем. Оптические методы мониторинга фитопланктона являются общепринятыми в мировой практике. В настоящее время для анализа состояния обширных акваторий используются данные, получаемые со спутниковых сканеров цвета. Однако для получения достоверных данных о состоянии фитопланктона спутниковые данные должны быть верифицированы по натурным измерениям в нескольких точках обследуемой акватории. К основным недостаткам определения хлорофилла а описанным способом относятся невозможность получения результатов в режиме реального времени и значительные ошибки, связанные с фильтрацией воды и экстракцией фитопланктона. При этом определение хлорофилла а не дает полного представления о спектральных характеристиках фитопланктона и его способности поглощать свет, так как при одинаковой концентрации хлорофилла а количество дополнительных пигментов может значительно варьировать. Кроме того, экстрагированные из фитопланктона пигменты могут иметь спектральные характеристики, отличные от спектров поглощения фитопланктонных организмов. В мировой практике были оценены различные экспериментальные подходы к определению пигментного состава фитопланктона [Merzlyak et al., 2007; Suggett et al., 2010].

Исследование больших массивов данных лабораторных и полевых исследований показало, что размеры клеток фитопланктона могут быть использованы для объяснения большой части вариаций в форме спектра поглощения фитопланктона. Знание того, насколько изменения в пигментации связаны с таксономическими и физиологическими изменениями фитопланктона, может помочь в разработке полуаналитических моделей и углубить понимание изменений

в спектрах поглощения фитопланктона. Вариации концентрации дополнительных пигментов и эффектов упаковки могут оказать существенное влияние на поглощение хлорофилла, особенно в синей области спектра. Детальные исследования показали, что 14-42 % вариации поглощения хлорофилла при 440 нм можно отнести к эффектам различных сочетаний пигментов. Прямое определение спектрального коэффициента поглощения суспензии фитопланктона, сконцентрированной центрифугированием, в кюветах с оптическим путем 1 см на стандартных двулучевых спектрофотометрах с интегрирующей сферой можно проводить в условиях высокой концентрации фитопланктона. Распространение этого метода ограничено низкой чувствительностью и возможностью его использования только в редких экологических ситуациях, когда концентрация фитопланктона чрезвычайно высока. Такой метод определения спектрального коэффициента поглощения хорошо подходит для суспензий культур водорослей при учете рассеяния света, возникающего на клетках водорослей. Способ компенсации спектров поглощения на рассеяние, предложенный Мерзляком и Негви, нашел чрезвычайно широкое распространение. Он состоит в измерении спектров ослабления света при расположении объекта на разных расстояниях от интегрирующей сферы спектрофотометра [Merzlyak, Nagvi, 2000].

В течение последних десятилетий в литературе активно обсуждается возможность применения для измерения абсорбционных свойств воды так называемого измерителя поглощения в полости интегрирующей сферы (Integrating Cavity Absorption Meter, ICAM). Предполагается, что такие измерения дадут возможность оценить таксономический состава фитопланктона по поглощению его пигментов и количество растворенного органического вещества (РОВ). Существенными преимуществами использования интегрирующей сферы является отсутствие потерь света, обусловленных светорассеянием, и значительное увеличение чувствительности в результате многократного прохождения света через образец. Ряд авторов использовали устройства различной геометрии, с зеркальным или рассеивающим покрытием полости сферы и размещением источника света внутри или вне сферы [Babin, Stramski, 2002]. Сообщалось об использовании подобного подхода для анализа фитопланктона, а также РОВ в природных водах [Járvorfi et al., 2006]. Однако применение этого подхода требует специальной коррекции и калибровки, учитывающих отклонения от закона Ламберта-Бера, «искажение» измеряемых спектров по сравнению со стандартными спектрофотометрическими измерениями в плоскопараллельных кюветах, возможный вклад флуоресценции и присутствие примесей. Способ коррекции спектров, полученных методом ICAM, приведен в работе [Погосян и др., 2017]. Дополнительные сведения о специфических особенностях спектроскопии ICAM различных таксономических групп фитопланктона является необходимым условием для корректного применения такой методологии [Glukhovets et al., 2018].

Оптическая схема устройства для измерения в полости интегрирующей сферы приведена на рис. 1. Пробы воды помещают в сферическую кварцевую колбу, помещенную во внутреннюю поверхность сферы, изготовленной из флуорилона (Fluorilon 99-WTM). В качестве источника полихромного излучения используют стабилизированную галогеновую лампу большой мощности, свет от которой, через коллиматор и комбинацию цветных светофильтров, установленных для выравнивания спектральной характеристики источника света, направляется на входное окно интегрирующих сфер. Регистрацию излучения, выходящего из интегрирующей сферы, через кварцевый световод проводят при помощи спектрометра USB-2000 (Ocean Optics, Inc., США). Спектр ослабления излучения рассчитывается как $D(\lambda) = -\lg(I/I_0)$, где I и I_0 , соответственно, спектры излучения прошедшего через сферу, заполненную образцом и раствором сравнения (в различных экспериментах: среда культивирования микроводорослей, фильтрованная через фильтры GF/F (фирма «Whatman», Великобритания) морская вода, дистиллированная вода).



Рис. 1. Оптическая схема устройства для измерения в полости интегрирующей сферы (ICAM)

Применение ICAM обеспечивает высокую чувствительность оценки содержания пигментов. Наиболее высокая чувствительность измерений наблюдается при небольших количествах поглощающего материала, когда *D* не превышала 0,05–0,1 и пропорциональна концентрации клеток. В этом диапазоне эффективная длина оптического пути в сфере превосходит 1,5 м. При этом чувствительность определения хлорофилла составляла десятые доли мг на м³. При больших количествах материала обнаруживаются значительные отрицательные отклонения от линейной зависимости. В качестве примера использования ICAM приведены результаты измерения спектров поглощения проб морской воды из Японского и Черного морей до и после фильтрации через волоконные стеклянные фильтры GF/F, задерживающие частицы размером более 0,7 мкм (рис. 2).



Рис. 2. Спектры частиц (а) и растворенного органического вещества (б), зарегистрированные с помощью интегрирующей сферы, в пробах Японского (кривые 1 и 2) и Черного (кривые 3–7) морей. Глубина взятия проб: 1 — 0 м, 2 — 6 м, 3 — 0 м, 4 — 10 м, 5 — 20 м, 6 — 30 м и 7 — 40 м [Погосян и др., 2009]

Стандартный протокол для спектрофотометрического анализа РОВ («желтого» вещества) предполагает измерения профильтрованных образцов в кюветах с длиной оптического пути 10 см. Применение ICAM позволило надежно регистрировать спектры образцов, полученных после фильтрации через фильтры GF/F (см. рис. 2). Спектры, записанные против дистиллированной воды, характеризовались присущим РОВ поглощением, монотонно возрастающим к коротким длинам волн. В спектрах фильтратов практически отсутствует поглощение в полосах основных пигментов фитопланктона. Тем не менее трудно исключить определенный вклад в поглощение фильтрата нано- и пикопланктона, прошедшего через фильтр. Спектры поглощения образцов, отобранные на разных глубинах, мало различались между собой. Пробы, отобранные в Японском море, обладали значительно более высоким поглощением. Из представленных спектров следует, что в образцах из Японского моря поглощение РОВ около 400 нм сопоставимо, а в пробах из Черного моря — превосходит поглощение частиц, задерживаемых фильтром GF/F.

Спектры поглощения частиц морской воды существенно отличались от спектров культур водорослей. По-видимому, это обусловлено присутствием в природных водах, наряду с фитопланктоном, терригенных взвесей, а также других окрашенных частиц биологического происхождения. Спектры частиц из морской воды, зарегистрированные с помощью ICAM против фильтратов, характеризовались полосой поглощения хлорофилла в области 670–680 нм и также других пигментов при более коротких длинах волн. Образцы, отобранные в Японском море, обладали значительно более сильным поглощением с выраженными полосами коло 500 и 550–560 нм. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о перспективности использования техники ICAM для регистрации фитопланктона и РОВ непосредственно в пробах морской воды [Конюхов и др., 2012]. Представленные данные свидетельствуют о перспективности использования метода ICAM для определения in situ пигментного состава фитопланктона, а также РОВ непосредственно в пробах морской воды. Данный метод прост и может быть использован в рутинной экспедиционной работе.

Индивидуальные клетки водорослей в составе популяции обладают значительной вариабельностью функционального состояния их фотосинтетического аппарата, что было показано методами измерения параметров флуоресценции хлорофилла клеток [Воронова и др., 2002, 2009; Погосян и др., 1996, 1998, 2002, 2017; Pogosyan et al., 1997, 2005; Suggett, 2010]. При помощи этого метода было показано, что распределения по параметрам состояния фотосинтетического аппарата лабораторных культур водорослей изменяются в зависимости от стадии роста популяции [Воронова и др., 2002, 2009; Ильяш и др., 2012], при дефиците биогенных элементов [Воронова и др., 2009], влиянии различных токсических веществ [Погосян и др., 1996], повреждающим действии интенсивного видимого и УФ-излучения [Погосян и др., 1998], адаптации к различным условиям пребывания [Ильяш и др., 2012; Погосян и др., 2017]. Характер распределения клеток по параметрам функционирования фотосинтетического аппарата дает дополнительную информацию о состоянии природной среды, в которой находятся водоросли. Широко используемыми параметрами состояния фотосинтетического аппарата являются: величина интенсивности флуоресценции хлорофилла F₀, соответствующая содержанию фотосинтетических пигментов ассоциированных в состав фотосистемы 2 при полностью открытых реакционных центрах; значение интенсивности флуоресценции хлорофилла F_m, соответствующая условиям полностью закрытых реакционных центров фотосистемы 2, величина относительной переменной флуоресценции (F_m - F₀)/F_m, соответствующая потенциальной эффективности первичных процессов фотосинтеза фотосистемы 2, величина относительной переменной флуоресценции при действии света заданной интенсивности $(F'_m - F_l)/F'_m$, соответствующая эффективности первичных процессов фотосинтеза фотосистемы 2 в данных условиях; скорость электронного транспорта через фотосистему 2 — ЕТК и величина нефотохимического тушения возбужденных состояний фотосинтетических пигментов NPQ, являющаяся показателем степени защиты фотосинтетического annaрата от света избыточно высокой интенсивности [Demmig-Adams et al., 2014].

Определение функционального состояния отдельных клеток водорослей дает возможность оценить вклад нескольких массовых видов в общее содержание фотосинтетических пигментов и продукцию фитопланктонного сообщества. Эти исследования позволяют прогнозировать краткосрочную динамику численности отдельных видов водорослей в составе фитопланктонного сообщества [Погосян и др., 2002, 2017].

Разработанные к настоящему времени методы оценки состояния фотосинтетического аппарата растений основаны на анализе кривой индукции флуоресценции — изменения квантового выхода флуоресценции хлорофилла во времени под действием света высокой интенсивности после адаптации клетки в темноте или на свету заданной интенсивности [Suggett et al., 2010].

Микрофлуориметр для оценки состояния фотосинтетического аппарата индивидуальных клеток водорослей собран на базе микроскопа ЛЮМАМ И-3 (Россия). На объект, находящийся в фокусе объектива и фотометрируемой зоны, подаются короткие вспышки света, возбуждающего флуоресценцию хлорофилла клетки, и производится измерение интенсивности ее флуоресценции. Диаметр регулируется сменными зондами и диафрагмой. Это позволяет получить соотношение сигнал/шум до 1000/1, что особенно актуально при высокой концентрации растворенного флуоресцирующего органического вещества в пробах воды.

Нами была проведена модификация микроскопа, в результате которой в нем была реализована общепринятая технология измерений флуоресценции с импульсной модуляцией интенсивности возбуждающего света. Основная оптическая схема микроскопа осталась без изменений. В качестве источника возбуждающего света использовали синий светоизлучающий диод (L1C1-RYL1000000000, Luxeon, США). Флуоресценцию хлорофилла выделяли светофильтрами ПС-8 и КС-18. Для регистрации флуоресценции использовали ФЭУ с мультищелочным фотокатодом (R7400U-20, Hamamatsu, Япония), усилитель постоянного тока с граничной частотой 200 кГц (-3 дБ) и блок управления и обработки сигналов с 16-битным АЦП (Analog Devices, США).

Светоизлучающий диод генерирует импульсы света прямоугольной формы продолжительностью 4 мкс (рис. 3). Интенсивность излучения светодиода в фо-

кальной плоскости объектива составляет 25 000 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ на длине волны 445 нм. Интенсивность флуоресценции с длиной волны более 680 нм регистрируется синхронно с импульсами возбуждающего флуоресценцию света как разность между выходными напряжениями усилителя в момент, когда светодиод включен, и в момент, когда светодиод не работает (через 6 мкс после отключения). Частота следования импульсов задается блоком управления и определяет среднюю интенсивность светового облучения клетки. В процессе измерений эта частота автоматически изменяется по программе в широких пределах, что существенным образом влияет на скорость переноса электронов на фотосинтетических мембранах, на процессы регуляции первичных процессов фотосинтеза и на интенсивность флуоресценции хлорофилла.



Рис. 3. Временная диаграмма измерения кривой индукции флуоресценции хлорофилла клетки

При регистрации кривой индукции флуоресценции хлорофилла клетки частота записи сигнала флуоресценции в первую миллисекунду насыщающего облучения равна 100 кГц, а затем она снижается до 5 кГц, что достаточно для полноценной регистрации более медленного J-I-P-участка кривой индукции флуоресценции хлорофилла клетки. Измерение кривой индукции имеет продолжительность от 0,2 до 1 с. Клетки планктонных водорослей находятся в камере Нажотта на предметном столике микрофлуориметра. Поиск клеток осуществляют в режиме подсветки снизу при помощи препарата-водителя. Когда клетка попадает в поле зрения микроскопа, сначала корректируют фокусировку, а затем клетку помещают в фотометрирующую зону прибора — темный круг в центре поля зрения. Затем отключают подсветку. После адаптации клетки к темноте, продолжительностью не менее 1 мин, производится определение интенсивности флуоресценции хлорофилла клетки F_0 . Для этого сигнал флуоресценции усредняется от 20 импульсов возбуждающего света, которые следуют с интервалами не менее 0,25 с. При регистрации кривой индукции флуоресценции программа позволяет в регулируемом временном диапазоне вести измерения быстрых процессов с высокой точностью — 100 000 измерений в секунду и дальнейшего насыщения электрон-транспортной цепи — 5000 измерений в секунду. Интерфейс прибора и пример получаемой индукционной кривой представлен на рисунке 4.



Рис. 4. Интерфейс микрофлуориметра для регистрации кривой индукции флуоресценции хлорофилла от клетки диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenski*oeldii. В верхней части интерфейса указаны времена следования импульсов возбуждающего света (вставка 1). В левом нижнем углу интерфейса указаны рассчитанные значения F_o , F_m и $(F_m - F_o)/F_m$ с значением ошибки среднего (вставка 2). Красным цветом показана кривая после усреднения

После адаптации клетки к длительному освещению — PFD для более точного определения интенсивности флуоресценции F_t усреднение производится по 64 импульсам. Расчет интенсивностей флуоресценции хлорофилла клетки F_m и F'_m осуществляется по 100 соседним точкам на кривой индукции флуоресценции в области достижения ее максимального уровня. На основании данных, полученных при измерении кривой индукции флуоресценции хлорофилла клетки, производится вычисление величины фотохимического квантового выхода фотосистемы 2, соответствующего эффективности функционирования этой фотосистемы:

$$\varphi'(\text{PFD}) = \frac{\Delta F'}{F'_m} = \frac{F'_m(\text{PFD}) - F_t(\text{PFD})}{F'_m(\text{PFD})},$$

которое будет зависеть от интенсивности предварительного светового облучения и стремиться к отношению

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

при PFD = 0.

Программа работы прибора дает возможность на одной клетке провести серию измерений кривой индукции флуоресценции с последовательным увеличением интенсивности предварительной световой адаптации (до 30 различных значений PFD). Таким образом, получаются световые кривые параметра $\varphi'(PFD)$ (рис. 5).



Рис. 5. Зависимость параметров флуоресценции хлорофилла F_t , F'_m и $F'_v/F'_m = (F'_m - F_t)/F'_m$ от интенсивности света на примере клетки диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskioeldii*

Полученные значения эффективности фотосинтеза (F'_v/F'_m) и интенсивности действующего света (PFD) могут быть пересчитаны в световые кривые (скорости линейного электронного транспорта — rETR) [Sugget et al., 2010]:

$$rETR(PFD) = PFD \cdot \varphi'(PFD).$$

Данный параметр, его максимальное значение и интенсивность PFD, при котором rETR достигает половины от этого значения (рис. 6), характеризуют видовую специфику клетки микроводоросли и ее адаптацию к условиям облучения.



Рис. 6. Зависимость эффективности электронного транспорта rETR от интенсивности света на примере клетки диатомовой водоросли *Thalassiosira nordenskioeldii*

По тем же исходным данным можно рассчитать нефотохимическое тушение [Suggett et al., 2010]:

$$NPQ(PFD) = \frac{F_m}{F'_m(PFD)} - 1.$$

Величина NPQ показывает интенсивность потерь энергии в фотосистеме 2 при интенсивном облучении для защиты фотосинтетического annapata [Demming-Adams et al., 2014]. Прибор позволяет определить значение NPQ, характерное для вида и условий адаптации к световым условиям фитопланктонных организмов.

В качестве примера использования микрофлуориметрического метода для определения функционального состояния индивидуальных клеток фитопланктона далее представлены некоторые результаты работ, проведенных в полярных морях России на НИС «Академик Мстислав Келдыш» в летне-осенний период 2018 года.

Обследованные акватории Карского моря и моря Лаптевых имеют малое содержание фитопланктона и низкую первичную продукцию, что обусловлено многими факторами, один из которых — двухслойная структура, которая практически не перемешивается. Верхняя легкая вода с низкой соленостью по данным гидрохимии имеет очень малое количество биогенных элементов, а нижний слой воды — соленый, с достаточно большим содержанием биогенов. Но нижний слой, как правило, находится за пределами зоны, в которой процессы фотосинтеза способны обеспечить рост водорослей из-за низкой интенсивности света, по причине высокого содержания рассеивающих частиц в верхнем слое [Флинт и др., 2018]. Такие условия предполагают адаптационные изменения фотосинтетического аппарата водорослей как в верхнем, так и в заглубленном слоя воды. Для подтверждения этого предположения нами была предпринята попытка использовать микрофлуориметрический метод оценки состояния фотосинтетического аппарата индивидуальных клеток. В качестве объекта обследования были выбраны клетки полярной диатомовой водоросли Thalassiosira nordenskioeldii и Chaetoceros decipiens, как представители массовых видов данного фитопланктонного сообщества. Среднее значение квантового выхода фотосистемы 2 (F_m - F_o)/F_m для всей совокупности клеток водорослей было достаточно высоким — 0,56, соответствующим благоприятным условиям минерального питания, кроме того, как в верхнем, так и в нижнем горизонте были обнаружены клетки с квантовым выходом > 0,7, что соответствует бездефицитному росту микроводорослей [Воронова и др., 2002, 2009]. Анализ распределения индукционных кривых флуоресценции хлорофилла клеток водорослей (F_m - F_o)/F_m по критерию Колмогорова-Смирнова показал, что все клетки представляют собой единую совокупность. Учитывая влияние двуслойной структуры воды в данной акватории, можно предположить различное состояние фотосинтетического аппарата клеток микроводорослей в поверхностном (освещенном) и глубинном (относительно богатом биогенами) горизонтах по эффективности утилизации света высокой интенсивности и величине нефотохимического тушения возбужденных молекул хлорофилла. Потенциальная эффективности фотосистемы 2 (F_v/F_m) достоверно не различалась в группах клеток, обитающих в поверхностном и глубинном слоях воды, в то время как под световой нагрузкой на фотосинтетический аппарат (PFD от 50 до 200 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) — величины $\Delta F'/F'_m$, отражающие способность клеток утилизировать световую энергию, достоверно различаются. Данный параметр явно коррелирует с показателем максимального электронного транспорта (rETR_{max}) и световым полунасыщением электрон-транспортной цепи (1/2 PFD-rETR_{max}), а также косвенно позволяет судить об отношении пула переносчиков к размеру антенного комплекса. Большинство клеток из верхнего горизонта имели более мощную систему тушения по сравнению с клетками нижнего горизонта. Клетки, находящиеся длительное время в верхнем горизонте и адаптированные к повышенному облучению и дефициту азота в среде, приводят к увеличению нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла.

На основании полученных данных была проведена «слепая» кластеризация по наиболее достоверно различающимся параметрам для всех видов суммарно (NPQ_{max} и dF'/F'_m при 50 мкмоль·м⁻²·c⁻¹) полагая, что глубина обнаружения клетки в данных условиях определяет адаптационные различия в фотосинтетическом аппарате (рис. 7).



Рис. 7. Результаты кластеризации микроводорослей методом *К*-средних по функциональному состоянию фотосинтетического аппарата (всех обнаруженных видов суммарно). Обозначены центры полученных кластеров и их границы

Выявлены два кластера с указанными центрами, при этом степень соответствия глубины отбора пробы и принадлежности к кластеру составляет более 74 %. Результат кластеризации подтверждает предположение о существенном отличии адаптационных характеристик фитопланктона в столбе воды. Точки, не попавшие в «свой» кластер, вероятно, являются переходными состояниями фотосинтетического аппарата клеток, недавно изменивших положение в столбе воды.

Выше представлены данные методических возможностей микрофлуориметрического метода в решении проблем функционирования фитопланктонного сообщества. Представляется, что одной из самых важных задач многих исследований является оценка первичной продукции фитопланктона. На отдельных клетках можно измерить величину потока электронов через фотосистему 2 при разных интенсивностях света, вызывающих фотосинтез. Так называемую величину ETR (скорость электронного транспорта) можно определить по измерениям клетки микрофлуориметром, как показано выше. Микрофлуориметр существенно расширяет возможности исследования внутрипопуляционной гетерогенности планктонных водорослей и оценивает вклад индивидуальных видов в продукцию фитопланктонного сообщества. Высокая чувствительность микрофлуориметра обеспечивает возможность оценивать состояние фотосинтетического аппарата практически любых клеток микрофитопланктона. Поддержание на объекте температуры, соответствующей условиям среды обитания водорослей, высокий уровень автоматизации измерений и их компьютерная обработка позволяют полагать, что такой прибор найдет широкое применение в исследованиях функционального состояния природного фитопланктона и лабораторных культур водорослей.

Анализ гетерогенности состояний фотосинтетического аппарата отдельных видов в фитопланктонном сообществе позволяет предсказывать и моделировать эволюцию сообщества на основании представлений о скорости роста и конкуренции микроводорослей, чего не позволяют иные методы. Таким образом, использование микрофлуориметрического метода позволяет получить данные для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата клеток популяций микроводорослей и составить краткосрочный прогноз динамики их численности в данном фитоценозе.

К сожалению, использование микрофлуориметрического метода пока не нашло широкого распространения. Видимо, это обусловлено тем, что коммерческие приборы с характеристиками, близкими к описанному выше, не нашли применения. Единственная фирма, заявлявшая о продаже микрофлуориметра, — Walz (Германия) позже на запрос о продаже сообщила о том, что прекратила выпуск этих приборов.

Литература

- Воронова Е. Н., Волкова Э. В., Казимирко Ю. В., Чивкунова О. Б., Мерзляк М. Н., Погосян С. И., Рубин А. Б. Изменения фотосинтетического аппарата клеток микроводоросли Thalassiosira weissflogii в ответ на действие света высокой интенсивности // Физиология растений. — 2002. — Т. 49, № 3. — С. 350–359.
- Воронова Е. Н., Ильяш Л. В., Погосян С. И., Уланова А. Ю., Маторин Д. Н., Ман-Го Чо, Рубин А. Б. Внутрипопуляционная гетерогенность параметров флуоресценции у морской планктонной водоросли Thalassiosira eissflogii при разной обепеченности азотом // Микробиология. — 2009. — Т. 78, № 3. — С. 1–10.

Добровольский В. В. Основы биогеохимии. — М.: Высшая школа, 1998. — 413 с.

Ильяш Л. В., Курочкина В. А., Белевич Т. А., Погосян С. И. Флуоресценция отдельных клеток водоросли Conticribra weissflogii при гиперосмотическом стрессе // Вопросы современной альгологии. — 2012. — № 2 (2).

- Кобленц-Мишке О. И., Ведерников В. И. Первичная продукция // Биология океана. М.: Наука, 1977. Т. 2. С. 183–209.
- Конюхов И. В., Селина М. С., Морозова Т. В., Погосян С. И. Опыт непрерывного флуориметрического мониторинга фитопланктона на буйковой станции // Океанология. — 2012. — Т. 52, № 1. — С. 139.
- Мерзляк М. Н., Чивкунова О. Б., Маслова И. П., Накви Р. К., Соловченко А. Е., Клячко-Гурвич Г. Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей // Физиол. раст. — 2008. — Т. 55, № 3. — С. 464–470.
- Погосян С. И., Дургарян А. М., Конюхов И. В., Чивкунова О. Б., Мерзляк М. Н. Абсорбционная спектроскопия микроводорослей, цианобактерий и растворенного органического вещества: измерения во внутренней полости интегрирующей сферы // Океанология. — 2009. — Т. 49, № 6. — С. 934–939.
- Погосян С. И., Сивченко М. А., Максимов В. Н. Физиологическая гетерогенность популяции микроводорослей. Классификация цинобиев Scenedesmus quadricauda по типам кривых индукции флуоресценции хлорофилла // Известия РАН. Серия биологическая. 1996. № 3. С. 337–373.
- Погосян С. И., Волкова Э. В., Казимирко Ю. В., Максимов В. Н., Рубин А. Б. Изменения фотосинтетического аппарата индивидуальных клеток микроводорослей *Ankistrodesmus falcatus* в норме и при УФ-облучении // Докл. РАН. — 1998. — Т. 363. — С. 690–693.
- Погосян С. И., Зайцева А. Ф. Обзор существующих оптических методов определения in situ пигментного состава фитопланктона // Вода: химия и экология. 2015. № 11. С. 35–43.
- Погосян С. И., Маторин Д. Н., Волкова Э. В., Антал Т. К., Казимирко Ю. В., Востоков С. В., Рубин А. Б. Флуоресцентные методы оценки состояния фитопланктона в Черном море // Комплексные исследования северо-восточной части Черного моря / Отв. ред. А. Г. Зацепин, М. В. Флинт. — М.: Наука, 2002. — С. 436–447.
- Погосян С. И., Конюхов И. В., Рубин А. Б. Проблемы экологической биофизики. М.– Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2017. — 272 с.
- Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции. — М., 1977. — 297 с.
- Флинт М. В. и др. Экосистемы морей Сибирской Арктики. Материалы экспедиционных исследований 2015 и 2017 гг. М.: ИО РАН, АПР, 2018. 232 с.
- Шварц С. С., Пястолова О. А., Добринская Л. А., Рункова Г. Г. Эффект группы в популяциях водных животных и химическая экология. М.: Наука, 1976. 152 с.
- Шифрин К. С. Введение в оптику океана. Л.: Гидрометеоиздат, 1983.
- Antoine D., Andre J.-M., Morel A. Oceanic primary production 2 // Global Biogeohem. Cycles. — 1996. — Vol. 10, No. 1. — P. 57–69.
- Babin M., Stramski D. Light absorption by aquatic particles in the nearinfrared spectral region // Limnol. Oceanogr. — 2002. — Vol. 47. — P. 911–915.

- Glukhovets D. I., Sheberstov S. V., Kopelevich O. V., Zaytseva A. F., Pogosyan S. I. Measuring the seawater absorption factor using integrating sphere // Light & Engineering. 2018. Vol. 26, No. 1. P. 120–126.
- Jávorfi T., Erostyák J., Gál J., Buzády A., Menczel L., Garab G., Naqvi K. R. Quantitative spectrophotometry using integrating cavities // J. Photochem. Photobiol. B. — 2006. — Vol. 82. — P. 127–131.
- Merzlyak M. N., Chivkunova O. B., Gorelova O. A., Reshetnikova I. V., Solovchenko A. E. Effect of Nitrogen Starvation on Optical Properties, Pigments and Arachidonic Acid Content of the Unicellular Green Alga Parietochloris incisa (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. — 2007. — Vol. 43. — P. 833–843.
- Merzlyak M. N., Naqvi K. R. On recording the true absorption spectrum and the scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium Anabaena variabilis // J. Photochem. Photobiol. B. — 2000. — Vol. 58, No. 2. — P. 123– 129.
- Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W. W., Govindjee. Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria // Book. Advances in Photosynthesis and Respiration. — 2014. — Vol. 40. — P. 649.
- Olson R. J., Chekalyuk A. M., Sosik H. M. Phytoplankton photosynthetic characteristics from fluorescence induction assays of individual cells // Limnol. Oceanogr. — 1996. — Vol. 41. — P. 1253–1263.
- Pogosyan S. I., Sivchenko M. A., Maximov V. N., Ostrowska M. Physiological heterogenety of an algal population: classification of Scenedesmus quadricauda cenobia by the features of their photosynthetic apparatus // Oceanologia. — 1997. — Vol. 39. — P. 163– 175.
- Pogosyan S. I., Matorin D. N. Variability in condition of the photosynthetic system of the Black sea phytoplankton // Ocanology. 2005. Vol. 45, No. 1. P. 139–148.
- Suggett D., Prasil O., Borowitzka M. Chlorophyll *a* Fluorescence in Aquatic Sciences // Methods and Applications. 2010. DOI: 10.1007/978-90-481-9268-7.10.

Achievements and prospects of ecological biophysics

S. I. Poghosyan

Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia E-mail: pogosyan@biophys.msu.ru

The development of methods for a more accurate determination of the content of photosynthetic pigments and the associated assessment of the primary production of aquatic environments is an urgent problem of ecology. A method for measuring in the cavity of the integrating sphere (ICAM), developed at the Department of Biophysics, is presented, which provides a high sensitivity for assessing the content of pigments of phytoplankton particles and dissolved organic matter without preliminary preparation of natural water samples. As an example of using ICAM, the results of measuring the absorption spectra of seawater samples from the Japanese and Black Seas are given.

A fundamentally new microfluorimeter has been developed and tested under expeditionary conditions, which makes it possible to assess the state of the photosynthetic apparatus of individual cells of planktonic algae by the parameters of chlorophyll fluorescence. The microfluorimeter makes it possible to assess the content of photosynthetic pigments in the cells of each type of algae in the phytoplankton community, to determine the efficiency of the primary processes of photosynthesis of each cell and the dependence of the electron flux through photosynthesis II on the light intensity (light curve of photosynthesis), which is an indicator of cell production, as well as to determine the level of non-photochemical quenching the photosynthetic apparatus of the cell. The sensitivity limit of this microfluorimeter is 10^{-12} grams of chlorophyll in the object, which makes it possible to reliably measure the parameters of chlorophyll fluorescence of single cells of microphytoplankton.

Keywords: primary production, chlorophyll, phytoplankton, absorption methods, microfluorimetry, individual cells.

ПРОСТЫЕ ПОПУЛЯЦИОННЫЕ МОДЕЛИ С ОЧЕНЬ СЛОЖНОЙ ДИНАМИКОЙ: 50 ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ В ДВНЦ АН СССР И ДВО РАН

Е. Я. Фрисман¹, Г. П. Неверова², О. Л. Жданова²

Важным этапом в понимании механизмов, вызывающих популяционные колебания, стало применение достаточно простых рекуррентных уравнений к изучению и моделированию динамики численности тех биологических видов, которые характеризуются четко выраженным сезоном размножения и стадийностью развития. Рекуррентные уравнения позволили объяснить резкие колебания численности популяций при сравнительно постоянных внешних условиях. Таким образом, получил убедительное модельное подтверждение тот факт, что периодические колебания, наблюдаемые в живых системах, могут определяться не только внешними воздействиями, но и внутренними свойствами самой популяционной системы. В данном разделе представлены основные результаты по моделированию популяционной динамики, которые были получены на Дальнем Востоке России в ходе становления и развития подхода, основанного на системах рекуррентных уравнений. Описана эволюция научных идей по пути усложнения дискретных во времени моделей — от модели Мальтуса до современных моделей, учитывающих ряд факторов, влияющих на популяционную структуру и динамику, и отражающих широкий спектр возможных динамических режимов. Рассмотрены динамические эффекты, к которым приводят плотностно-зависимая регуляция, возрастная, стадийная и генетическая структуры, влияние внешних факторов. Обнаруженные динамические эффекты позволяют описывать и анализировать ряд явлений, наблюдаемых в природе, например возникновение и исчезновение колебаний в рамках одной популяции и генетическую дифференциацию особей. Особое внимание уделено возможностям применения рекуррентных моделей к анализу и описанию динамики реальных популяций. При этом необходимо отметить, что в рамках этих задач математическая модель создавалась и настраивалась под конкретный биологический вид, учитывая особенности его жизненного цикла. Так, например, при анализе и моделировании динамики промысловых заготовок из локальной популяции маньчжурской белки Sciurus vulgaris mantchuricus была учтена зависимость численности этого вида от урожайности кедровых орехов (его основного корма). При моделировании динамики стад пятнистого оленя Cervus nippon и северного морского котика Callorhinus ursinus необходимо было учитывать сложную поло-возрастную структуру рассматриваемых видов, при этом параллельно и весьма успешно решались задачи оптимального ведения оленеводческого и котикового хозяйства. Также в данном разделе обсуждаются возможные перспективы развития в области применения моделей с дискретным временем к моделированию популяционной динамики.

¹ Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, 679016 Биробиджан, ул. Шолом-Алейхема, 4.

² Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН, 690041 Владивосток, ул. Радио, 5. E-mail: frisman@mail.ru

Ключевые слова: популяционная динамика, математическое моделирование, рекуррентные уравнения, возрастная структура, эколого-генетические модели, мультистабильность и мультирежимность.

Данный раздел посвящен истории становления одного из подходов к математическому моделированию популяционной динамики, активно развиваемому на Дальнем Востоке России. Приведены наиболее яркие результаты, успехи и проблемы, а также перспективные направления развития рассматриваемого подхода в будущем.

Основоположник Дальневосточной школы математической биологии Александр Павлович Шапиро предложил использовать для описания динамики популяций математические модели, основанные на достаточно простых рекуррентных уравнениях первого порядка. Оказалось, что эти модели обладают удивительно сложным динамическим поведением, но их весьма непросто «настроить» под описание динамики реальных популяций. Поэтому простые рекуррентные модели пришлось усложнять, учитывая дополнительные факторы, такие как неоднородность (структурированность) рассматриваемых популяций и влияние внешних условий. Так, например, моделирование динамики промысловых заготовок из локальной популяции маньчжурской белки Sciurus vulgaris mantchuricus стало успешным только после учета зависимости скорости воспроизводства популяции от урожайности кедровых орехов (основного корма белки), а также введения нелинейной функциональной зависимости доли изъятия от численности популяции. В работах по динамике численности северного морского котика Callorhinus ursinus и пятнистого оленя Cervus nippon необходимо было учитывать сложную поло-возрастную структуру этих видов, а для оленя еще и зависимость коэффициентов воспроизводства и выживаемости от запасов пищи и площади оленьих парков. Учитывать сложную возрастную структуру видов, а также нелинейную функциональную зависимость доли промыслового изъятия от величины численности потребовалось для адекватного моделирования динамики тихоокеанских лососей (род Oncorhynchus).

Модифицированные модели хорошо описывали наблюдаемую динамику реальных популяций. Вместе с тем подгонка параметров этих моделей сама по себе оказалась весьма сложной задачей, решение которой балансировало на грани, соединяющей расчетную технику и искусство. При этом ориентация лишь на точечные оценки параметров весьма ненадежна: даже небольшое их изменение может привести к значительным изменениям популяционной динамики. В результате стала очевидной необходимость детального теоретического исследования уже новых модифицированных моделей.

К этому времени развитие компьютерной техники достигло значительного уровня, что позволило детально исследовать динамику более сложных моделей, первыми из которых стали модели локальной популяции с двумя стадиями развития. Серия теоретических работ в этом направлении показала, что динамика такой двухвозрастной популяции оказывается существенно более разнообразной, чем динамика однородной популяции. Помимо сценария удвоения периода здесь появилась реализация сценария Неймарка–Сакера, а также проявление мультистабильности и мультирежимности. Верификация этих моделей на данных о динамике численности рыжей полевки и нескольких видов насекомых (совки сосновой, пяденицы сосновой, серой лиственничной листовертки) показала хорошее соответствие модельных режимов с динамикой реальных популяций.

Богатый спектр новых свойств, возникающих при суперпозиции даже самых простых моделей, был обнаружен в процессе разработки экологогенетического подхода моделирования. Результаты моделирования эволюции структурированных лимитированных популяций оказались весьма неожиданными и противоречащими интуитивному пониманию эволюционного процесса, при этом динамика разработанных эколого-генетических моделей на качественном уровне хорошо описывает тенденции эволюции, наблюдаемые в реальных популяциях песцов Alopex lagopus и тихоокеанской горбуши Oncorhynchus gorbuscha. Здесь все еще остро стоит проблема верификации эколого-генетических моделей из-за невозможности получить достаточно длинные временные ряды наблюдений эволюционной динамики. Проблема отсутствия данных необходимого объема и качества также является ключевой для верификации целого пласта великолепных теоретических результатов, полученных на сообществах миграционно-связанных популяций. Для соотнесения выявленных эффектов с реальностью требуются данные одновременных наблюдений многих локаций на продолжительном интервале времени.

Захватывающие перспективы открываются при моделировании биологических сообществ, где предполагается получение колоссального разнообразия новых эффектов, таких как наложение колебаний разных периодов у конкурирующих видов, наложение внутрипопуляционных колебаний и ценотических колебаний, связанных с взаимодействиями типа ресурс–потребитель, хищник– жертва или паразит–хозяин, и многое другое.

Введение

В 1798 году Томас Мальтус опубликовал работу «Essay on the Principle of Population» («Опыт о законе народонаселения») [Malthus, 1986], в которой привел обоснование модели, описывающей рост численности населения земли по геометрической прогрессии со знаменателем, названным впоследствии мальтузианским параметром. Эта работа не только послужила основой для многих демографических и мировоззренческих концепций, но и стимулировала развитие основополагающих биологических теорий.

Так, Чарльз Дарвин приводит и подробно анализирует модель Мальтуса в первой части своей знаменитой книги: «On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life» («Происхождение видов путем естественного отбора, или сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь») [Darwin, 1859], а затем использует ее в качестве одного из обоснований своей концепции естественного отбора. «Золотой век» математической биологии начался в первой половине ХХ века феерическим всплеском работ, надолго определивших последующее развитие теоретической экологии и математической популяционной генетики, основы синтетической теории эволюции. Создатели синтетической «генетической» теории эволюции Р. Фишер [Fisher, 1930], С. Райт [Wright, 1930], Дж. Холдейн [Haldane, 1932] и С. С. Четвериков [Четвериков, 1926] фактически применяли модель Мальтуса, полагая мальтузианский параметр зависимым от генотипа, а основоположники теоретической популяционной экологии (динамической теории экосистем) Пьер Ферхюльст [Verhulst, 1845] и Вито Вольтерра [Вольтерра, 1976] (а также Г. Ф. Гаузе [Гаузе, 1935]) рассматривали модель Мальтуса, в которой мальтузианский параметр являлся функцией численности популяции (или нескольких численностей взаимодействующих популяций).

Математической базой этих работ были изящные модели, построенные на основе систем дифференциальных уравнений и удачно описывающие многие популяционные феномены, наблюдающиеся в природных биологических сообществах: колебания численностей, конкурентное вытеснение, полиморфное разнообразие и многое другое. В начале 70-х годов XX века математическая популяционная биология пополнилась достаточно простыми, но весьма эффектными моделями, основанными на рекуррентных уравнениях. Неожиданно оказалось, что эти «простенькие» модели обладают колоссальным разнообразие м возможных динамических режимов, весьма сложно эволюционирующих при изменении параметров модели.

Эти исследования начинались во времена активного развития интересных отечественных школ математической биологии в Москве, Пущино и Ленинграде. Руководителями этих школ были яркие исследователи и организаторы науки: академик Н. Н. Моисеев, профессора А. М. Молчанов, Р. А. Полуэктов, Ю. М. Свирежев.

В Новосибирске была своя школа математических биологов, отчасти руководимая выдающимися людьми: членом-корреспондентом АН СССР А. А. Ляпуновым и ярким кибернетиком И. А. Полетаевым, но фактически созданная и выпестованная профессором В. А. Ратнером. Из этой школы вышли директора институтов СО РАН (Института цитологии и генетики и Института биофизики) академики Н. А. Колчанов и А. Г. Дегерменджи.

Во Владивостоке руководителем школы математической биологии был А. П. Шапиро, талантливый математик, выпускник Ленинградского университета. Именно А. П. Шапиро параллельно с исследователем Р. Мэем (уроженцем Австралии, физиком-теоретиком, впоследствии ставшим британским экологом) активно способствовали развитию нового класса моделей математической популяционной биологии, основанных на достаточно простых рекуррентных уравнениях, которые, как оказалось, обладали крайне сложным динамическим поведением. Результаты своих работ Р. Мэй опубликовал в самых престижных журналах Science, Nature [May, 1976], American Naturalist, Journal Theoretic Biologic [May, 1975]. Благодаря этой активной научной деятельности Роберт Мэй сделал блестящую научную карьеру: был Президентом Королевского научного общества Великобритании (2000-2005), в 2001 году назначен пожизненным пэром Робертом и получил титул — барон Мэй Оксфордский. А. П. Шапиро совершенно независимо и несколько раньше Р. Мэя получил аналогичные (если не сказать точно такие же) научные результаты, но опубликовал их в сборниках научных трудов, изданных в Дальневосточном научном центре АН СССР [Шапиро, 1972]. Эти работы оказались известны достаточно узкому кругу исследователей и не получили должного признания.

Рассмотрим теперь более подробно основные результаты, полученные в ранних работах по моделированию популяционной динамики, выполненному на основе рекуррентных уравнений. Далее в последовательности, соответствующей историческому ходу развития этого направления исследований в ДВНЦ АН СССР и ДВО РАН, представим и обсудим ключевые и наиболее интересные научные результаты, полученные в процессе становления и развития Дальневосточной школы математической биологии.

Моделирование динамики численности популяций с неперекрывающимися поколениями

Для однолетних растений, многих видов насекомых, некоторых видов рыб, земноводных и пресмыкающихся каждая отдельная популяция представляет собой один возрастной класс, и смежные поколения такой популяции не перекрываются. Если условия среды меняются от поколения к поколению не очень сильно, то численность некоторого поколения будет определяться только численностью предыдущего поколения. Обозначив через N_n численность *n*-го поколения, можно записать следующее уравнение, описывающее динамику численности такой одновозрастной популяции:

$$N_{n+1} = F(N_n). \tag{1}$$

Простейший вид этого уравнения для $F(N_n) = rN$, где r — некоторая постоянная (т. е. каждая особь оставляет в следующем поколении в среднем r потомков, независимо от численности родительской популяции), фактически является моделью Мальтуса:

$$N_{n+1} = rN_n. \tag{2}$$

Решение этого уравнения представляет собой геометрическую прогрессию со знаменателем r и начальным членом N_0 , что фактически идентично экспоненциальному росту численности популяции при отсутствии лимитирующих факторов.

Хорошо известно, что достаточно долгий экспоненциальный рост численности в природе никогда не наблюдается. Рано или поздно сказывается действие лимитирующих факторов, поэтому коэффициент r в уравнении (2) оказывается функцией численности. Положим r = af(N), где f(N) — функция, описывающая лимитирование, и a — параметр, называемый репродуктивным потенциалом популяции и характеризующий скорость роста популяции в пустоту (т. е. a выбирается так, чтобы выполнялось f(0) = 1). Теперь вместо уравнения (2) получаем:

$$N_{n+1} = aN_n f(N_n). \tag{3}$$

Именно такие модели исследовали А. П. Шапиро [Шапиро, 1972] и Р. Мэй [Мау, 1975, 1976]. Они показали, что динамика численности популяции, описываемая уравнением (3), может быть весьма сложной, если функция F(N) = aNf(N) убывает при больших N достаточно быстро (например, быстрее, чем $1/N^2$).

Конкретизируя вид функции f(N), для уравнения (3) численно можно построить бифуркационную диаграмму, характеризующую предельные траектории в зависимости от величины коэффициента *a*. Хорошо изучен дискретный аналог модели Ферхюльста, для которого f(N) = 1 - kN, и модель, предложенная канадским ихтиологом У. Рикером [Ricker, 1954], для которой $f(N) = \exp(-kN)$. При исследовании уравнения (3) обычно исключают масштабный параметр *k* и переходят к безразмерным переменным: «относительным» численностям x = kN. В этом случае дискретный аналог модели Ферхюльста имеет вид: $x_{n+1} = a x_n (1 - x_n)$, а модель Рикера: $x_{n+1} = a x_n \exp(-x_n)$. На рисунке 1 приведены динамические режимы модели Рикера и бифуркационная диаграмма, характеризующая предельные траектории в зависимости от величины коэффициента *a*.

Рассмотрим кратко характер динамики, представленной на рисунке 1. При 0 < a < 1 устойчиво тривиальное равновесие, далее при a = 1 происходит транскритическая бифуркация, в результате которой нулевое решение теряет устойчивость, а нетривиальное равновесие становится устойчивым до $a < e^2$. При $a = e^2$ происходит бифуркация удвоения периода, и при $a > e^2$ рождается устойчивый 2-цикл. Элементы 2-цикла располагаются на «вилке» по обе сторо-

ны от неустойчивого ненулевого равновесия. С дальнейшим ростом значений параметра *a* усложнение динамики реализуется по сценарию М. Фейгенбаума [Feigenbaum, 1983]. Так, при $a \approx 12,49$ 2-цикл теряет устойчивость, в результате чего от каждого из элементов 2-цикла появляются еще по 2 элемента, т. е. рождается 4-цикл, и т. д. Следует отметить, что в результате каскада бифуркаций удвоения периода 4-цикл эволюционирует до 128-цикла в узком диапазоне значений 12,49 $\leq a \leq 14,79$ [Скалецкая и др., 1979]. Описанные изменения характера динамики численности, связанные с изменением параметра модели и заключающиеся в возникновении серии устойчивых циклических траекторий с длинами циклов, равными целым степеням числа 2, принято называть первой серией бифуркаций. Эта серия заканчивается при значении параметра *a* называемой «точкой накопления», при переходе через которую поведение численности популяции теряет сколько-нибудь регулярный характер и становится хаотическим. Однако зоны хаотического поведения численности перемежаются с «окнами» периодического, т. е. регулярного поведения.



Рис. 1. (а) Бифуркационная диаграмма и (б–ж) решения рекуррентного уравнения $x_{n+1} = ax_n \exp(-x_n)$ при разных значениях репродуктивного потенциала — параметра *a*: (б) монотонное схождение к равновесию; (в) сходящиеся колебания; (г) 2-цикл; (д) 4-цикл; (е–ж) нерегулярная динамика

Очень интересным частным случаем, обобщающим уравнения Ферхюльста и Рикера, является трехпараметрическая модель Хассела [Hassell, 1975]:

$$N_{n+1} = \frac{aN_n}{\left(1 + \gamma N_n\right)^{\beta}}$$

Эта модель позволяет исследовать динамику численности популяции при различной интенсивности экологического лимитирования, характеризующегося параметром β (увеличение которого приводит к росту скорости убывания f(N) == $1/(1 + N)^{\beta}$, при больших N). Так, при малых значениях параметра β ($\beta < 2$), т. е. при слабом лимитировании, немонотонных режимов динамики численности не наблюдается ни при каких значениях параметра *a*, характеризующего скорость размножения вида. Это справедливо, например, при $\beta = 1$, т. е. для случая, когда модель Хассела переходит в модель Бивертона–Холта. Однако при больших значениях β ($\beta > 3$) монотонное увеличение параметра *a* приводит к осуществлению первой серии бифуркаций, а затем и к возникновению хаотического режима динамики, т. е. к перестройкам, аналогичным модели Рикера.

С другой стороны, при больших фиксированных значениях параметра a (при a = 30 и более) рост параметра β приводит к таким же перестройкам режима динамики численности популяции, что и рост параметра a при фиксированных значениях β . Различие заключается в том, что при росте β бифуркации происходят на фоне падения равновесного уровня численности, тогда как при росте a — на фоне его роста. Таким образом, двумерное пространство параметров a и β разбивается на ряд областей, каждая из которых характеризуется своим типом динамического поведения.

Исследование хаотических режимов динамического поведения, получаемого в моделях Рикера, Хасселла и др., позволяет выявить некоторые общие закономерности, проявляющиеся при достаточно больших значениях репродуктивного потенциала и степени экологического лимитирования. Если в начале такого хаотического поведения значение численности невелико, то в течение достаточно большого ряда последовательных поколений будет наблюдаться медленный рост (который может сопровождаться в отдельных поколениях небольшим спадом), после чего происходит резкое увеличение численности (скачок вверх), сопровождающееся в следующей генерации значительно большим падением ее до значения, близкого к начальному уровню. Эти периодические «переломы» не будут, однако, возвращать популяцию точно на начальный уровень. Следовательно, несмотря на явный периодический характер изменения численности, не будет обнаружено полных совпадений ни по значениям численности, ни по числу генераций в фазе возрастания. Подобное не строго периодическое поведение численности характерно для многих естественных популяций высших организмов, особенно насекомых (например, саранчи, кузнечиков, ночных мотыльков).

Вместе с тем, несмотря на большое разнообразие наблюдаемых динамических режимов, рассмотренные простые динамические модели, основанные на одномерных рекуррентных уравнениях первого порядка, весьма трудно «настраиваются» под описание динамики реальных популяций. Для достижения адекватности приходится модифицировать эти модели, учитывая в новых модификациях неоднородность (структурированность) рассматриваемых популяций и влияние внешних условий.

Моделирование динамики реальных популяций

Переход от «теоретических» моделей динамики гипотетических популяций к описанию динамики реальных популяций животных требует существенного уточнения и конкретизации структуры моделей. Кроме того, в большинстве случаев динамика реальных популяций существенно регулируется лимитирующими ресурсами среды обитания и это необходимо явно учитывать при моделировании. Так, например, при анализе и моделировании динамики величины промысловых заготовок из локальной популяций маньчжурской белки *Sciurus vulgaris mantchuricus* было замечено, что численность этого вида существенно зависит от урожайности кедровых орехов, основного корма этого вида. Кроме того, Е. В. Ашихмина обратила внимание на тот факт, что величина (доля) промыслового изъятия существенно и нелинейно зависит от численности популяции. Охотники вели интенсивный промысса белки при большой численности и практически отказывались от промысла в периоды депрессии. Выявление этих закономерностей позволило построить следующую модель динамики численности сти популяции маньчжурской белки [Ashichmina et al., 1985]:

$$x_{n+1} = \frac{ax_n}{1 + Ax_n} \exp\left(-\frac{b_n x_n}{1 + Ax_n}\right),\tag{4}$$

где x_n — численность популяции в *n*-м году, A — коэффициент, характеризующий интенсивность промысла, b_n — величина, характеризующая интенсивность экологического лимитирования в *n*-м году. Поскольку величина экологического лимитирования существенно определяется запасом кедровых орехов в годы созревания и рождения потомства, то *b* полагалась линейной функцией от урожайности орехов в двух смежных годах: $b_n = b_0 - b_1C_n - b_2C_{n+1}$, где C_n — урожайность кедровых орехов в *n*-м году, b_0 , b_1 , b_2 — соответствующие коэффициенты.

Согласно предложенной модели, величина заготовок (R_n) из популяции белок связана с численностью популяции следующим нелинейным соотношением:

$$R_n = \frac{Ax_n^2}{1 + Ax_n}.$$
(5)

Имея достаточный ряд данных о величинах заготовок, можно определить коэффициенты уравнения (4) и величину начальной численности, которые

обеспечивают минимум суммы квадратов отклонений реальных величин заготовок от их расчетных значений, полученных по формуле (5). Такие оценки были сделаны, и оказалось, что модель (4), (5) дает весьма хороший прогноз величины заготовок: она «отловила» и достаточно точно «предсказала» будущий пик величины заготовок, в несколько раз превосходящий максимум значений заготовок в предшествующие годы, на которых подбирались и калибровались параметры модели (рис. 2, a).



Рис. 2. Сопоставление данных учетов и результатов моделирования. (а) Динамика заготовок маньчжурской белки. (б) Численность щенков северного морского котика

В оленеводстве при учете и анализе динамики стад пятнистого оленя *Cervus nippon* в возрастной структуре выделяются следующие группы особей: телята, неполовозрелые особи первого года жизни, неполовозрелые особи второго года жизни и половозрелые особи. Кроме того, каждая возрастная группа состоит из двух подгрупп, разделяющихся по полу. Количество телят определяется численностью самок и коэффициентом рождаемости, а численности старших возрастов определяются соответствующими коэффициентами выживаемости. Исследования, проведенные Е. И. Скалецкой, показали, что коэффициент рождаемости существенно зависит от площади угодий, на которых происходит выпас (так называемых «оленьих парков»), а коэффициенты выживаемости в большей степени определяются доступными запасами корма. Этот факт приводит к оригинальной оптимизационной задаче — определению размеров и структуры стада, способного обеспечить максимальное количество пантов (основной продукт пантового оленеводства) при заданных размерах угодий и запасах кормов. Такая задача была решена для оленеводческих хозяйств Приморского края [Shapiro et al., 1984; Скалецкая и др., 1988].

При анализе и моделировании динамики численности популяций северного морского котика (*Callorhinus ursinus*) наряду со сложной возрастной структурой важно было учесть зависимость коэффициента рождаемости от соотношения численностей половозрелых самок и самцов. Оказалось, что эта зависимость хорошо и содержательно может быть описана следующей формулой:

$$b = \frac{kM}{pF + M},\tag{6}$$

где b — коэффициент рождаемости, F и M — численности самок и самцов, соответственно, k — верхний предел коэффициента рождаемости, p — параметр, характеризующий роль самцов в популяции: чем меньше p, тем меньше самцов (меньшая доля) необходимо для успешного воспроизводства популяции.

Было построено несколько моделей динамики численности популяции северного морского котика, различающие детализацией возрастного состава. «Минимальная» модель описывала динамику численностей четырех групп особей: новорожденных детенышей (щенков), самок, неполовозрелых самцов (часть популяции, подвергающаяся регулярному промыслу) и половозрелых самцов — секачей, наиболее хорошо учитывающихся в ходе визуальных наблюдений [Скалецкая и др., 1980]. «Максимальная» модель содержала более 20 переменных и учитывала детальную возрастную структуру самок и самцов [Frisman et al., 1982; Zhdanova et al., 2017; Фрисман и др., 2019]. Каждая из этих моделей весьма неплохо «прогнозировала» динамику численности секачей: модуль разности модельных значений и данных учета численности не превышал 5 % от числа секачей. Однако прогнозные модельные значения численности приплода, начиная с середины 70-х годов, заметно превосходили учетную численность. В отдельные годы различие достигало 20 %. Анализ моделей и тщательная оценка коэффициентов по данным о динамике численности и доли рожающих самок показали, что основным коэффициентом, определяющим долю рожающих самок и, соответственно, численность приплода, является параметр р. Оценочное значение этого параметра по данным до 1980 года составляло 0,014, что соответствовало 48 % беременности самок. Однако оценка, сделанная по более поздним данным, привела к значению p = 0,025 и средней беременности самок 35 % (рис. 2, б). Эти оценочные значения параметров давали вполне удовлетворительный прогноз численности щенков и свидетельствовали о негативных процессах, связанных, скорее всего, с воздействием промысла.

Хотя промысел и был ориентирован на изъятие неполовозрелых самцов, не участвующих в размножении, однако он носил явно селективный характер и, в конечном счете, привел к снижению численности потомства. Дело в том, что в результате промысла из популяции изымались молодые самцы, физически здоровые, с нормальным (если не повышенным) гормональным статусом, с хорошим состоянием меха и повышенной тягой к лежбищам. Таким образом, из популяции изымались потенциально сильные производители, а оставались более слабые [Фрисман и др., 2019]. Это и привело к росту параметра *p* и падению доли беременных самок. Рассмотренный пример демонстрирует очень существенные возможности, которое дает математическое моделирование при решении содержательных биологических задач, формировании и обосновании биологических гипотез и получении важных содержательных интерпретаций и выводов.

Для анализа и моделирования популяций **тихоокеанских лососей** (род *Oncorhynchus*), имеющих весьма сложную возрастную структуру, применялась следующая модель динамики численности [Фрисман, Ласт, 2004, 2005; Frisman et al., 2006]:

$$x_{n+k} = a \sum_{i=0}^{k-1} \gamma_{k-i} x_{n+i} e^{-x_{n+i}}.$$
 (7)

Величина а соответствует репродуктивному потенциалу популяции, k максимальный возраст особей, а коэффициенты γ_i — доли соответствующих возрастов в родительском стаде. Значения коэффициентов для трех видов лососей: чавычи, кеты и кижуча были подобраны по данным для популяций р. Большая, для нерки — по данным для популяции оз. Азабачье (Камчатка). Полученные значения возрастных коэффициентов и репродуктивного потенциала кеты и кижуча соответствовали устойчивому стационарному состоянию в популяции, не подверженной промыслу. Значения коэффициентов, полученные для нерки и чавычи, соответствовали нерегулярной динамике неэксплуатируемых популяций. Далее была построена модель популяций в случае, когда осуществлялся интенсивный промысел. При этом учитывалась нелинейная функциональная зависимость доли промыслового изъятия от величины численности. Для численного подбора коэффициентов модели были взяты данные об общих американских уловах тихоокеанских лососей (нерки, кеты, кижуча и чавычи) в Беринговом море (Западная Аляска). Анализ модели показал, что промысел существенным образом влияет на популяционную динамику и часто препятствует ее регуляризации. Таким образом, было обосновано предположение, что реальная нерегулярная динамика кеты и кижуча в значительной мере оказывается связана именно с многолетним промыслом, а наблюдаемые колебания численностей нерки и чавычи могут быть обусловлены как естественными факторами, так и ведением промысла.

На основании большого количества данных, полученных в ходе систематического учета численности, проведен анализ основных тенденций динамики численностей **охотничье-промысловых зверей, обитающих на территории Еврейской автономной области** (ЕАО). Для количественного анализа основных тенденций изменения численности промысловых популяций применен метод математического моделирования и использовались простейшие модели популяционной динамики. Показано, что при некоторой стабильности общей численности большинства промысловых животных на всей территории EAO с середины 90-х годов прошлого века просматривается устойчивая тенденция к снижению численности, особенно на тех территориях, где ведется промысел [Фрисман и др., 2007; Фрисман, Ревуцкая, 2018]. Впечатление стабильности в EAO в целом связано с положением животных на охраняемых территориях. Так, для всех рассматриваемых промысловых видов на территории заповедника «Бастак» наблюдается явная тенденция роста численности. Сохранение численности многих промысловых видов определяется миграционной активностью. Наличие заповедных территорий способствует поддержанию и даже некоторому росту численности, но этого оказывается явно недостаточным. Необходимо расширение территорий свободных от промысла и переход к стратегиям жестких периодических ограничений промысла из популяций, испытывающих депрессивный режим динамики численности.

Анализ динамических режимов, наблюдаемых в моделях динамики популяции, состоящих из нескольких возрастных классов

В простейших моделях популяционной динамики рассматриваются лишь изменения общей численности популяции. Вместе с тем, в случаях, когда продолжительность жизни (онтогенез) каждого поколения оказывается существенно больше времени, протекающего между сезонами размножения, каждая локальная популяция во время размножения состоит из особей, принадлежащих к разным возрастным группам или стадиям развития, которые могут существенно различаться популяционными параметрами: коэффициентами выживаемости, фертильности и т. п. В этом случае численности каждой выделяемой стадии развития естественно рассматривать в качестве отдельных переменных модели. Способ разбиения популяции на возрастные группы или стадии развития обычно определяется биологическими особенностями рассматриваемого вида.

Рассмотрим модель динамики структурированной популяции, которая может быть представлена совокупностью двух возрастных классов: младшего и старшего, которые существенно различаются значениями популяционных параметров.

Обозначим через X_n и Y_n численности особей младшего и старшего классов, соответственно, в *n*-й сезон размножения. Период размножения заканчивается появлением каких-то форм следующего поколения (например, откладкой яиц, икрометом или новорожденных особей). Будем предполагать, что времени, протекающего между двумя последовательными периодами размножения, достаточно для развития «новорожденных» форм до младшего возраста, а особей младшего возраста до состояния старшего возраста. Допустим, что выживаемость и воспроизводительная способность старших особей не зависит от биологического возраста. Это правомерно для организмов с небольшим временем жизни, включающим два-три периода размножения, как у многих насекомых, рыб, двух-, трехлетних растений и др.

Уравнения динамики, связывающие численности выделенных возрастных классов в смежных поколениях, в этом случае имеют вид:

$$\begin{cases} X_{n+1} = B_1(X_n, Y_n)X_n + B_2(X_n, Y_n)Y_n, \\ Y_{n+1} = S(X_n, Y_n)X_n + V(X_n, Y_n)Y_n, \end{cases}$$
(8)

где $B_1(X, Y)$ и $B_2(X, Y)$ — коэффициенты рождаемости, а S(X, Y) и V(X, Y) — коэффициенты выживаемости младшего и старшего возрастных классов соответственно.

Исследование различных вариантов модели (8) имеет долгую историю. Так, в ранних работах [Шапиро, 1983; Фрисман и др., 1988; Фрисман, 1994] были приведены результаты исследования частного случая модели (8), когда выживаемость молоди линейно или экспоненциально зависела от численности младшего возрастного класса. Также рассматривалась задача плотностно зависимой регуляции фертильности старшего возрастного класса в зависимости от его численности. Было показано [Фрисман, Скалецкая, 1994], что если ограничение скорости роста популяции осуществляется путем снижения выживаемости половозрелых особей с увеличением их численности, то потеря устойчивости равновесного состояния сопровождается появлением 2-цикла.

Однако более полное и детальное исследование общего случая, когда предполагается, что коэффициенты рождаемости и выживаемости являются функциями численности соответствующих групп, стало возможно в период бурного развития компьютерной техники и сопутствующих информационных технологий.

Подробное исследование модели (8) и аналогичных ей систем, выполненное Е. В. Ласт, О. Л. Ждановой, Г. П. Неверовой, О. Л. Ревуцкой, М. П. Кулаковым и др., показало следующее. Наиболее эффективными механизмами регуляции роста численности являются: уменьшение рождаемости с ростом числа взрослых особей и падение выживаемости приплода с увеличением его численности. Вместе с тем, именно такая регуляция роста численности при увеличении репродуктивного потенциала приводит к возникновению колебаний численности, имеющих весьма сложную временную организацию. Серия теоретических работ в этом направлении показала, что динамика такой двухвозрастной популяции оказывается существенно более разнообразной, чем динамика однородной популяции: помимо сценария удвоения периода здесь появилась реализация сценария Неймарка–Сакера. Зона параметрической устойчивости популяции может существенно увеличиться, если коэффициент выживаемости младшей возрастной группы будет уменьшаться не только с ростом численности приплода, но еще и с ростом численности половозрелых особей. Однако такой регуляторный механизм оказывает положительное влияние только при сравнительно слабом воздействии взрослых, не превосходящим авторегуляторную роль молоди. Регуляция выживаемости молоди преимущественно взрослыми особями оказывается малоэффективна: область устойчивости сильно сужается и при выходе из нее популяция испытывает колебания, подобные биениям [Фрисман и др., 2010; Frisman et al., 2011].

Уменьшение выживаемости половозрелых особей с ростом численности популяции не может служить эффективным механизмом сдерживания популяционного роста, однако этот тип регуляции способен существенно ослабить интенсивность и размах популяционных колебаний.

Увеличение продолжительности и сложности онтогенеза не увеличивает «в среднем» степень хаотизации популяционной динамики. В пользу большей динамической устойчивости говорит обнаруженное в моделях многовозрастных популяций расширение области значений репродуктивного потенциала, соответствующей стационарной динамике, сужение размаха флуктуаций численностей возрастных групп, а также преобладание областей, в которых аттракторы имеют очень небольшую степень хаотизации [Жданова, Фрисман, 2011].

Можно сказать, что удлинение и усложнение онтогенеза, создавая потенциальные возможности для увеличения хаотизации «в среднем», в конечном итоге оказывается способным обеспечить «обратный» переход «от хаоса к порядку» и даже привести к устойчивым динамическим режимам. Этот результат дает удивительно простое объяснение тому факту, что при достаточно широком спектре динамических режимов, теоретически возможных для популяций с возрастной структурой, реально найденные периоды исключительно узкие и многие «дикие» популяции демонстрируют, очевидно, стабильную либо околоциклическую динамику.

Оказалось, что различные частные варианты модели (8) можно весьма эффективно применять как для описания динамики популяций конкретных биологических, а так и для подробного анализа весьма общих динамических эффектов популяционной динамики.

В частности, при применении модели (8) к описанию динамики численности мышевидных грызунов естественно в качестве младшего возрастного класса рассматривать сеголеток (особей, родившихся в год размножения), а в качестве старшего — адультусов (перезимовавших особей). Кроме того, можно учесть, что рост популяции мышевидных грызунов регулируется преимущественно лимитированием рождаемости, которая почти всегда снижается при большой численности ближе к концу сезона размножения [Фрисман и др., 2014, 2015; Frisman et al., 2016]. Учитывая это, можно принять коэффициенты выживаемости S(X, Y) = s и V(X, Y) = v константами, а коэффициенты рождаемости $B_1(X, Y)$ и B₂(X, Y), по аналогии с моделью Рикера [Ricker, 1954], выбрать в виде: $B_1 = r_1 \exp(-\beta X_n - \gamma Y_n)$ и $B_2 = r_2 \exp(-\beta X_n - \gamma Y_n)$. Параметры r_1 и r_2 соответствуют репродуктивным потенциалам половозрелых групп, β и γ характеризуют интенсивность влияния численности разных возрастных групп на процессы воспроизводства и выживаемость неполовозрелой молоди. С целью уменьшения числа анализируемых параметров предполагается, что β и γ одинаковы для обеих половозрелых групп особей. В результате уравнения динамики (8) принимают вид:

$$\begin{cases} X_{n+1} = (r_1 X_n + r_2 Y_n) \exp(-\beta X_n - \gamma Y_n), \\ Y_{n+1} = s X_n + v Y_n. \end{cases}$$
(9)

Несложная замена переменных: $syX \rightarrow x$, $yY \rightarrow y$ и переобозначение параметров: $a_1 = r_1$, $a_2 = sr_2$, $\rho = \beta/(s\gamma)$ позволяет свести модель (9) к четырехпараметрической:

$$\begin{cases} x_{n+1} = (a_1 x_n + a_2 y_n) \exp(-\rho x_n - y_n), \\ y_{n+1} = x_n + v y_n, \end{cases}$$
(10)

где $a_1 > 0, a_2 > 0, \rho \ge 0, 0 < v \le 1$. Система (10) имеет единственное нетривиальное положение равновесия. Было проведено исследование устойчивости этого равновесия и изучены сценарии перехода к флуктуациям численности и нерегулярной динамике. Типичный вид области устойчивости ненулевого равновесия в пространстве параметров a_1 и a_2 , а также возможные сценарии перехода к колебаниям и хаотической динамике представлены на рисунке 3.

Как показано на рисунке 3, потеря устойчивости равновесного состояния возможна по двум сценариям. При изменении параметров модели и переходе через одну границу области устойчивости (и попадании в область неустойчивости, обозначенную С) потеря устойчивости стационарного решения происходит по сценарию Фейгенбаума, аналогичному рассмотренному выше для простых моделей без возрастной структуры: последовательно возникают устойчивые колебания численности с периодом в 2, 4, 8 и т. д. лет. При переходе через другую границу области устойчивости (и попадании в область неустойчивости, обозначенную В) потеря устойчивости реализуется по сценарию Неймарка-Сакера (аналогичному бифуркации Хопфа): динамика численности возрастных классов переходит в квазипериодический режим. Область квазипериодического режима пересекают многочисленные подобласти, называемые «языками Арнольда», в которых численности возрастных классов стремятся к строго периодическому режиму с фиксированным периодом. Современные вычислительные технологии позволяют построить достаточно подробный параметрический портрет динамических режимов модели (10), который представлен на рисунке 3, б.



Рис. 3. (а) Эскиз параметрического портрета и примеры динамических режимов модели (10). А. Переход к равновесию. В. Квазипериодические колебания. С. Цикл с периодом 2. (б) Карта динамических режимов модели (10) в пространстве параметров a_1 , a_2 при $\rho = 1,8$ и v = 0,01. Числами указаны периоды колебаний численности в соответствующих параметрических областях, НД — нерегулярная динамика

Частный вариант модели (10) можно использовать для описания динамики популяции насекомых, у которых есть две стадии развития: младшая (например, личиночная) и старшая, участвующая в размножении. В этом случае параметр $a_1 = 0$, и модель оказывается трехпараметрической. Если предположить, что взрослые особи не выживают до следующей генерации, то и v = 0 и модель (10) преобразуется к виду

$$\begin{cases} x_{n+1} = ax_n \exp(-x_n - \rho \cdot y_n), \\ y_{n+1} = x_n. \end{cases}$$
(11)

Система (11) имеет единственное ненулевое стационарное решение, область устойчивости которого представлена на рисунке 4, *a*. Как видно, границы области устойчивости имеют точку пересечения ($\rho = 1/3$, $a = e^4$), абсцисса которой разделяет между собой два сценария потери устойчивости. При $\rho < 1/3$ потеря устойчивости реализуется по сценарию Фейгенбаума (линия PD), при $\rho > 1/3$ по сценарию Неймарка–Сакера (граница NS). Динамические режимы, возникающие в области неустойчивости модели (11), представлены на рисунке 4, *б*.


Рис. 4. (а) Область устойчивости и (б) карта асимптотических динамических режимов модели (11). На карте цифрами обозначены длины наблюдаемых циклов, Q — квазипериодические колебания

Именно реализация сценария Неймарка-Сакера приводит к таким модельным режимам динамики численности, которые оказываются весьма схожими с режимами, наблюдаемыми в природных популяциях. Оценка параметров модели на основе данных о динамике реальных популяций насекомых приводит, как правило, к значениям параметров, попадающим в область нерегулярной (квазипериодической) динамики или в области «языков Арнольда» с точными циклами [Неверова, Фрисман, 2015; Neverova et al., 2016]. На рисунке 5 приведен пример реальной динамики численности популяции совки сосновой и соответствующая ей модельная траектория, полученная на основе оценок параметров модели (11). Также рисунок 5 дополнен результатами применения модели (11) к описанию динамики численности листовертки лиственничной Zeiraphera diniana Gn., полученными Л. В. Недорезовым и Д. Л. Садыковой [Nedorezov, Sadykova, 2015] (рис. 5, в). Точечные оценки параметров, соответствующие рассматриваемым видам, нанесены на карту динамических режимов модели (11) и видно, что они располагаются в глубине области квазипериодической динамики (рис. 5, б).

Аналогичные результаты можно получить, применяя модель (10) к описанию динамики численности реальных популяций грызунов [Фрисман и др., 2014, 2015; Frisman et al., 2016]. Так, оценка параметров этой модели осуществлялась по материалам многолетних учетов относительной общей численности (число особей на 100 ловушко-суток) рыжей полевки, обитающей на территории Удмуртского стационара, расположенного в бореальной зоне липовопихтово-еловых подтаежных лесов (57°20' с. ш., 52° в. д.). Модельная реализация, проведенная при полученных оценках параметров модели, в целом неплохо описывает тенденцию динамики, однако не полностью улавливает основные пики численности популяции рыжей полевки (рис. 6, *a*). Коэффициент детерминации, характеризующий качество аппроксимации, составил $R^2 = 0,681$.



Рис. 5. (а), (в) Реальная и модельная динамика популяций насекомых; б) карта динамических режимов модели (11), дополненная обозначениями точечных оценок параметров, соответствующих динамике реальных популяций. Числа соответствуют длинам циклов. Q — квазипериодическая динамика



Рис. 6. (а) Наблюдаемая динамика численности рыжей полевки и траектория модели (10); (б) результаты описания натурных данных моделью (10) с учетом (12); (в) динамика коэффициента Селянинова

Оцененные значения параметров находятся в зоне нерегулярной динамики, т. е. численность рыжей полевки подвержена квазипериодическим колебаниям.

Как нам представляется, расхождение данных наблюдений и моделирования связано с влиянием внешних факторов. Для того чтобы учесть влияние внешних факторов, предложена следующая модификация функций $B_i(X_n, Y_n) =$ $= r_i \exp(-\beta X_n - \gamma Y_n + kS_n)$, соответственно репродуктивные потенциалы в относительных численностях модели (10) принимают вид:

$$a_i(n) = a_i \exp(-\rho x_n - y_n - kS_n), \qquad (12)$$

где *k* — коэффициент, характеризующий интенсивность влияния внешнего фактора на процессы воспроизводства особей рыжей полевки, *S_n* — среднее значение гидротермического коэффициента Селянинова [Селянинов, 1928] за период

апрель-июль в *n*-м году. Данный коэффициент является характеристикой увлажненности территории (влагообеспеченности) в вегетативный период. Выбор именно этого показателя связан с тем, что он косвенно характеризует обилие корма, которое, как отмечается, существенно влияет на динамику численности популяции рыжей полевки. Включение внешнего фактора позволило отловить основные пики численности популяции (рис. 6, δ). Коэффициент детерминации увеличился и составил $R^2 = 0,847$.

В ходе детального исследования в модели (10) была обнаружено появление мультистабильности. Оказалось, что при ряде значений параметров в модели потенциально могут реализовываться разные устойчивые динамические режимы. Какой именно динамический режим будет реализован, определяется начальными условиями. В частности, есть заметная область значений параметров, когда из одних начальных условий (из одного бассейна притяжения) траектории системы стремятся к устойчивой нетривиальной неподвижной точке, а из других (из другого бассейна притяжения) — к устойчивому 3-циклу. Возможны ситуации, когда сосуществуют более двух различных устойчивых динамических режимов, например, устойчивая неподвижная точка и два различных устойчивых цикла с периодами 3 и 4.

Система (10) демонстрирует мультистабильность в окрестности точечной оценки параметров, соответствующей реальной динамике популяции рыжей полевки, обитающей в нестационарных условиях (рис. 7, *a*). На одновременное существование нескольких режимов указывает пересечение полупрозрачных областей устойчивости этих режимов. Рисунок 7, *a* показывает, что одновременно существуют циклы с периодами 3 и 7, 6 и 7, 4 и 3, 4 и 6 и т. д.

Модификация репродуктивного потенциала в соответствии с формулой (12) приводит к тому, что модель (10) перестает быть автономной, в ней появляются параметры, меняющиеся со временем. Так, вместо постоянных параметров a_1 и a_2 надо рассматривать функции от времени, которые имеют вид $A_1(n) = a_1 \exp(kS_n)$ и $A_2(n) = a_2 \exp(kS_n)$. На рисунке 7, *а* показаны значения, которые принимают функции A_1 и A_2 в разные сезоны наблюдения *n*. Видно, что точки с координатами ($A_1(n), A_2(n)$) попадают в области разных динамических режимов, включая хаотический режим для n = 6, и циклы длины 3, 6, 7, 12 и даже 14, а также в области мультистабильности, в которых сосуществуют конкурирующие аттракторы (рис. 7, δ).

Таким образом, можно предположить, что изменение погодных условий приводит к перескокам от одного динамического режима к другому. Так, для n = 14 численность популяции рыжей полевки может колебаться либо с периодом 6, либо 7. Однако уже для значений n от 15 до 18 модельная динамика будет близка к трехлетним колебаниям. А вот при n = 19 значения параметров опять попадают в область мультистабильности, где существуют 6 и 7 циклы.

В результате, ни один из этих режимов не успевает установиться, т. е. можно говорить о том, что реальная динамика — это череда переходных процессов [Neverova et al., 2019].



Рис. 7. (а) Карта динамических режимов системы (10) с учетом (12), дополненная значениями пар параметров $(A_1(n), A_2(n))$, обозначенных «крестами». Числа, от которых отходят стрелки к крестам — номера соответствующих сезонов наблюдения. (б) Бассейны притяжения, демонстрирующие смену наблюдаемого асимптотического режима динамики и изменение областей притяжения при вариации внешнего фактора (гидротермического коэффициента Селянинова). Числа внутри окрашенных областей показывают периоды регистрируемых циклов, Q и C — области квазипериодической и хаотической динамики

Кроме того, следует отметить, что даже в случае, когда вариация климатических условий не приводит к смещению оценки значений демографических параметров из области существования одного динамического режима в другой, смена динамического режима все равно может произойти при условии наличия мультистабильности. Это связано с тем, что вариация значений параметров, вызванная влиянием факторов среды, приводит к изменениям структуры бассейнов притяжения в области мультистабильности. И тогда изменения текущей численности могут привести к смене динамического режима, поскольку численность популяции смещается из бассейна притяжения одного режима в бассейн другого режима. В результате в текущем сезоне численность популяции попадает в бассейн притяжения режима, который принципиально отличается от того, который был в прошлом сезоне, и популяция начинает развиваться по принципиально иному сценарию. Итак, можно заключить, что влияние внешнего фактора ведет как к изменению бассейнов притяжения в области мультистабильности, так и «прыжкам» значений коэффициентов модели по параметрическому пространству, и траектория изменения численности постоянно переходит от одного динамического режима к другому. Как результат, численность популяции регулярно перескакивает из бассейна одного режима в бассейн другого и лишь в отдельные годы ненадолго (2–3 года) задерживается в диапазоне значений параметров, при которых наблюдаются схожие режимы (циклы одного периода). Другими словами, популяция, которая развивается в текущем году в одних условиях, стремится выйти на некоторый режим, а в следующем сезоне с иными условиями этот режим оказывается неустойчив или не существует, и, подстраиваясь под новые условия, популяция стремится выйти уже на другой режим.

Другими словами, при постоянных внешних условиях имела бы место эволюционная тенденция лишь к одному из перечисленных периодических режимов. Наиболее вероятным или ведущим в системе (10) является 3-цикл, который возможен в максимально широком диапазоне параметров. Однако из-за зашумленности, которую вносит климатический фактор, этот режим никаким образом не может быть достигнут и отмечен в динамике популяции рыжей полевки. Видимо поэтому не стоит ожидать точного соответствия между модельным и реальным временными рядами. Однако можно указать временные периоды, когда реальная динамика качественно совпадает с одним из периодических режимов автономной модели (10) (в смысле совпадения числа пиков и моментов их возникновения).

Наиболее важные результаты анализа моделей динамики популяций промысловых видов

В отсутствии промысла характер динамики численности популяции определяется величиной репродуктивного потенциала и наличием ресурсов жизнедеятельности (прежде всего кормовых запасов). При небольшом и среднем репродуктивном потенциале колебания численности фактически отражают (с некоторым запаздыванием) колебания пищевых запасов. Такую динамику мы наблюдаем у кабана, изюбря и некоторых других копытных. При большом репродуктивном потенциале колебания численности становятся резче и определяются, в основном, плотностно-зависимыми факторами, а колебания запасов корма играют фоновую роль. Типичный пример белка и колонок.

Ведение промысла снижает остроту колебаний, связанную с повышенной плотностью, но сохраняет колебания, связанные с изменением в кормовой базе. Поскольку интенсивность промысла зависит от уровня численности, промысел может как «раскачивать» вынужденные колебания, так и приводить к резкому

падению численности популяции вплоть до ее полного вырождения. Много примеров такого рода динамики промысловых запасов можно найти в статистике промыслового рыболовства.

На основе разработанной модели может быть поставлена и исследована задача оптимизации размера промыслового изъятия из популяции. Наиболее исследованы задачи оптимизации промысла для моделей однородной популяции [Скалецкая и др., 1979; Шапиро, Луппов, 1983; Абакумов, 1993]. В ходе таких исследований показано, что оптимальная интенсивность промысла не должна превышать степени природного экологического лимитирования популяции. Даны количественно обоснованные нормы изъятия для каждой промысловой популяции на текущий сезон и рассчитаны такие лимиты, которые обеспечивают максимально возможный уровень изъятия при сохранении запаса устойчивости популяций при возможных неблагоприятных внешних воздействиях.

В целом же ведение промысла с оптимальной долей изъятия, обеспечивающей максимум равновесного урожая в однородной популяции (т. е. без учета возрастной структуры), снимает популяционные колебания и приводит к стабилизации ее численности. Однако в случае двухвозрастной эксплуатируемой популяции максимальный устойчивый урожай (оптимальный промысел) возможен в случае изъятия особей только из одного возрастного класса [Жданова, Фрисман, 2013; Ревуцкая, Фрисман, 2017], что позволяет получать большую экономическую прибыль. Наиболее часто в практике коммерческого лова реализуется изъятие взрослой части популяции (как самок, так и самцов). Так, осетровые, сиговые и лососевые рыбы в зависимости от возраста имеют разную промысловую ценность [Фрисман, Ласт, 2005]. Примером избирательного промысла по полу является добыча «холостяков», трех-, четырехлетних самцов северного морского котика Callorhinus ursinus L., «серебристых» котиков [Скалецкая и др., 1980, Frisman et al., 1982; Zhdanova et al., 2017]. Вместе с тем, оказалось, что динамика эксплуатируемой популяции с возрастной структурой усложняется, если принимать в рассмотрение тот факт, что особи разного возраста с различной степенью интенсивности оказывают влияние на процессы рождаемости или выживаемости молоди [Неверова и др., 2016, 2017; Ревуцкая и др., 2018; Neverova et al., 2018]. Так, было показано, что равновесный промысел из двухвозрастной популяции, основанный на стратегии изъятия с постоянной оптимальной долей, обеспечивающей максимум равновесного урожая, возможен в ограниченной области параметрического пространства, где стационарные решения модели устойчивы. В случае потери устойчивости равновесной численности эксплуатируемой популяции эта стратегия приводит к колебаниям численности и перестает быть как равновесной, так и оптимальной [Ревуцкая, Фрисман, 2017; Неверова и др., 2017]. Стабилизация динамики системы происходит при стратегии промысла, основанной в регулярном изъятии излишка численности над значением, соответствующего величине максимального воспроизводства популяции [Ревуцкая, Фрисман, 2017].

В целом же развитие данных подходов имеет особое значение для решения задач рационального природопользования и в перспективе может привести к созданию новых стратегий использования промысловых биоресурсов и постепенному переходу от идеологии оптимального промысла к пониманию принципиальных положений сбалансированного хозяйственного природопользования.

Некоторые результаты анализа эколого-генетических моделей, основанных на рекуррентных уравнениях

Описанные выше исследования нелинейных моделей динамики популяций с возрастной структурой показали, что увеличение средней индивидуальной приспособленности приводит к колебаниям численности, а затем к возникновению хаотических аттракторов, структура и размерность которых меняются при изменении параметров модели. Естественным этапом развития данного направления было обобщить все результаты, свидетельствующие о том, что перечисленные типы динамики численности могли бы последовательно возникать в эволюции лимитированной популяции под действием плотностно-независимого естественного отбора, повышающего среднюю приспособленность популяции в соответствии с фундаментальной теоремой естественного отбора Р. Фишера. Эффект совокупного одновременного взаимодействия плотностнонезависимого отбора и плотностно-зависимых неселективных экологических лимитирующих факторов назван нами F-отбором.

В случае, когда репродуктивный потенциал *r* определяется генетически одним адаптивным аутосомным диаллельным локусом, уравнения динамики численностей возрастных групп популяции преобразуются и к ним добавляются уравнения динамики частот генов, характеризующие изменение генетической структуры в ходе эволюции двухвозрастной популяции [Фрисман, Жданова, 2009; Неверова и др., 2020]. При плотностно-зависимом лимитировании рождаемости уравнения эволюционной динамики имеют вид [Неверова и др., 2020]:

$$\begin{cases} x_{n+1} = r_n y_n \exp(-\rho x_n - y_n), \\ y_{n+1} = x_n + c y_n, \\ q_{n+1} = \frac{p_n \left(r_{11} p_n + r_{12} (1 - p_n)\right)}{w_n}, \\ p_{n+1} = \frac{q_n x_n + c p_n y_n}{y_{n+1}}, \end{cases}$$
(13)

а при лимитировании выживаемости младшего возрастного класса [Фрисман, Жданова, 2009]:

$$\begin{cases} x_{n+1} = r_n y_n, \\ y_{n+1} = x_n (1 - x_n) + c y_n, \\ q_{n+1} = \frac{p_n (r_{11} p_n + r_{12} (1 - p_n))}{r_n}, \\ p_{n+1} = \frac{x_n (1 - x_n) q_n + c y_n p_n}{y_{n+1}}, \end{cases}$$
(14)

где p_n и q_n — это частоты аллеля A_1 в старшем (*y*) и младшем (*x*) возрастном классах соответственно; параметры r_{11} , r_{12} и r_{22} характеризуют репродуктивные потенциалы генотипов A_1A_1 , A_1A_2 и A_2A_2 старшего возрастного класса; $r_n = r_{11}p_n^2 + 2r_{12}p_n(1-p_n) + r_{22}(1-p_n)^2$ — средний репродуктивный потенциал.

Несмотря на заведомое максимальное упрощение, моногенная модель отбора встречается в природе, ярким примером служит моногенный характер наследования размера помета у песцов *Alopex lagopus*. Т. И. Аксенович с соавторами [Axenovich et al., 2007] на основе комплексного сегрегационного анализа типа наследования размера приплода в расширенной генеалогии фермерских песцов показали, что данный заведомо адаптивный (напрямую определяющий приспособленность) признак является аутосомным признаком, а его наследование можно описать в рамках моногенной модели с контролем малого размера приплода по рецессивному типу.

Остановимся теперь кратко на результатах исследования моделей (13) и (14). Принципиально новым является обнаруженная здесь возможность возникновения устойчивых колебаний не только численности, но и частот генов. Вообще-то F-отбор не является плотностно-зависимым отбором, так как репродуктивные потенциалы генотипов постоянны и не зависят от уровня численности. Ожидалось, что F-отбор вызовет монотонное изменение частот, но при этом может привести и к изменению динамического режима популяции, создавая условия для г- и K-отбора. Но даже при таком типе отбора оказались возможны бифуркации, которые приводят к возникновению устойчивых колебаний частот аллелей [Фрисман, Жданова, 2009; Neverova et al., 2020].

При этом нарушается принцип простого объединения (суперпозиции) результатов двух моделей: плотностно-независимого естественного отбора и плотностно-зависимой регуляции роста численности; появляются режимы, которые не наблюдались отдельно в каждой из моделей: колебания частот генов, связанные с мультирежимностью рассматриваемых систем, которая возникает в результате бифуркационного появления новых устойчивых аттракторов (рис. 8).





369

Резюмируя, можно заключить, что рассмотренные в данном разделе динамические модели, основанные на рекуррентных уравнениях и возникшие как некоторая вспомогательная ветвь математического моделирования, оказались удивительно богаты как на обнаруженные динамические режимы, так и на обилие полученных с их помощью содержательных результатов. Есть все основания полагать, что они преподнесут еще немало изящных непредсказуемых эффектов. Много интересного ожидается при моделировании биологических сообществ, где предполагается получение колоссального разнообразия новых эффектов, таких как наложение колебаний разных периодов у конкурирующих видов, наложение внутрипопуляционных колебаний и ценотических колебаний, связанных с взаимодействиями типа ресурс–потребитель, хищник–жертва или паразит–хозяин [Neverova et al., 2019; Ревуцкая и др., 2019]. Так, широкий спектр новых свойств, возникающих при суперпозиции даже самых простых моделей, уже был обнаружен при исследовании эколого-генетических моделей [Неверова, Фрисман, 2020; Neverova et al., 2020; Neverova, Frisman, 2021].

Эколого-генетический подход открывает большие перспективы для изучения эволюции естественных популяций, а также для прогнозирования изменений, связанных с антропогенным воздействием. При этом возникают серьезные сложности, связанные с верификацией исследуемых моделей, так как для оценки используемых экологических и генетических параметров необходимы данные эколого-генетического мониторинга за естественными биологическими популяциями на длительном временном промежутке. Получить такие данные удовлетворительного объема и содержания практически невозможно. При этом динамика разработанных эколого-генетических моделей на качественном уровне хорошо описывает тенденции эволюции, наблюдаемые в реальных популяциях песцов *Alopex lagopus* [Жданова, Фрисман, 2016; Zhdanova, Frisman, 2021] и тихоокеанской горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* [Неверова, Фрисман, 2020; Neverova, Frisman, 2021].

Проблема отсутствия данных необходимого объема и качества также является ключевой для верификации целого пласта великолепных теоретических результатов, полученных в ходе исследования пространственно-временной динамики сообществ, представленных миграционно-связанными популяциями [Кулаков, Фрисман, 2018]. В этих моделях возникает сложное коллективное поведение, сопровождающееся кластерной синхронизацией в форме пятен, полос, спиралей, лабиринтных и мозаичных узоров из концентрации численностей. Могут возникать ситуации, когда в одной части ареала наблюдается синхронизация одних циклов, а в другой части принципиально других. Для соотнесения выявленных эффектов с реальностью требуются данные одновременных наблюдений многих локаций на продолжительном интервале времени. Получение таких данных — насущная необходимость будущих исследований.

Литература

- Абакумов А. И. Управление и оптимизация в моделях эксплуатируемых популяций. Владивосток: Дальнаука, 1993. — 129 с.
- Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование. М.: Наука, 1976.
- Гаузе Г. Ф. Исследования над борьбой за существование в смешанных популяциях // Зоол. журн. — 1935. — Т. 14, № 2. — С. 243-270.
- Жданова О. Л., Фрисман Е. Я. Нелинейная динамика численности популяции: влияние усложнения возрастной структуры на сценарии перехода к хаосу // Журнал общей биологии. — 2011. — Т. 72, № 3. — С. 214–229.
- Жданова О. Л., Фрисман Е. Я. Влияние оптимального промысла на характер динамики численности и генетического состава двухвозрастной популяции // Известия РАН. Серия биологическая. — 2013. — № 6. — С. 738-749.
- Жданова О. Л., Фрисман Е. Я. Математическое моделирование механизма дифференциации репродуктивных стратегий в естественных популяциях (на примере песцов, Alopex lagopus) // Компьютерные исследования и моделирование. — 2016. — Т. 8, № 2. — C. 213–228.
- Кулаков М. П., Фрисман Е. Я. Кластеризация и химеры в модели пространственновременной динамики популяций с возрастной структурой // Нелинейная динамика. — 2018. — Т. 14, № 1. — С. 13–31. — DOI: 10.20537/nd1801002.
- Неверова Г. П., Абакумов А. И., Фрисман Е. Я. Влияние промыслового изъятия на режимы динамики лимитированной популяции: результаты моделирования и численного исследования // Математическая биология и биоинформатика. — 2016. — T. 11, № 1. — C. 1–13.
- Неверова Г. П., Абакумов А. И., Фрисман Е. Я. Режимы динамики лимитированной структурированной популяции при избирательном промысле // Математическая биология и биоинформатика. — 2017. — Т. 12, № 2. — С. 327-342.
- Неверова Г. П., Жданова О. Л., Фрисман Е. Я. Возникновение сложных режимов динамики численности в ходе эволюции структурированной лимитированной популяции // Генетика. — 2020. — Т. 56, № 7. — С. 714–725.
- Неверова Г. П., Фрисман Е. Я. Математическое моделирование динамики локальных однородных популяций с учетом эффектов запаздывания // Математическая биология и биоинформатика. — 2015. — Т. 10, № 2. — С. 309–324.
- Неверова Г. П., Фрисман Е. Я. Режимы динамики популяции с неперекрывающимися поколениями с учетом генетической и стадийной структур // Компьютерные исследования и моделирование. — 2020. — Т. 12, № 5. — С. 1165-1190.
- Ревуцкая О. Л., Кулаков М. П., Фрисман Е. Я. Бистабильность и бифуркации в модифицированной модели Николсона-Бейли при учете возрастной структуры жертвы // Математическая биология и биоинформатика. — 2019. — Т. 14, № 1. — С. 257-278.
- Ревуцкая О. Л., Неверова Г. П., Фрисман Е. Я. Влияние промыслового изъятия на динамику популяций с возрастной и половой структурой // Математическая биология и биоинформатика. — 2018. — Т. 13 (1). — С. 270-289.

- Ревуцкая О. Л., Фрисман Е. Я. Влияние равновесного промысла на сценарии развития двухвозрастной популяции // Информатика и системы управления. 2017. № 3 (53). С. 36–48.
- Селянинов Г. Т. О сельскохозяйственной оценке климата // Труды по сельско-хозяйственной метеорологии. 1928. Т. 20. С. 165–177.
- Скалецкая Е. И., Фрисман Е. Я., Кузин А. Е. Математическое моделирование динамики численности северного морского котика. Простейшая модель локальной популяции // Журнал общей биологии. 1980. Т. 41, № 2. С. 270–278.
- Скалецкая Е. И., Фрисман Е. Я., Храмцов В. В. Оптимальное управление размерами и структурой стад пятнистых оленей Cervus nippon на основе математической модели популяционной динамики // Зоологический журнал. — 1988. — № 2. — С. 235–244.
- Скалецкая Е. И., Фрисман Е. Я., Шапиро А. П. Дискретные модели динамики численности популяций и оптимизация промысла. — М.: Наука, 1979. — С. 165.
- Фрисман Е. Я. Странные аттракторы в простейших моделях динамики численности популяций с возрастной структурой // Доклады РАН. — 1994. — Т. 338, № 2. — С. 282–286.
- Фрисман Е. Я., Жданова О. Л. Эволюционный переход к сложным режимам динамики численности популяции // Генетика. 2009. Т. 45, № 9. С. 1277–1286.
- Фрисман Е. Я., Жданова О. Л., Кузин А. Е. К чему привел промысел северного морского котика: результаты калибровки математических моделей по данным наблюдений (на примере популяции о-ва Тюлений) // Экология. — 2019. — № 2. — С. 149– 160.
- Фрисман Е. Я., Ласт Е. В. Динамическая неустойчивость промысловых популяций с возрастной структурой (на примере лососевых видов рыб) // Доклады РАН. 2004. Т. 394, № 4. С. 569–573.
- Фрисман Е. Я., Ласт Е. В. Нелинейные эффекты в популяционной динамике, связанные с возрастной структурой и влиянием промысла // Известия РАН. Серия биологическая. 2005. № 5. С. 425–437.
- Фрисман Е. Я., Луппов С. П., Скокова И. Н., Тузинкевич А. В. Сложные режимы динамики численности популяции, представленной двумя возрастными классами // Математические исследования в популяционной экологии. — Владивосток: ДВО АН СССР, 1988. — С. 4–18.
- Фрисман Е. Я., Неверова Г. П., Ревуцкая О. Л., Кулаков М. П. Режимы динамики модели двухвозрастной популяции // Известия вузов «Прикладная нелинейная динамика». — 2010. — Т. 18, № 2. — С. 111–130.
- Фрисман Е. Я., Неверова Г. П., Кулаков М. П., Жигальский О. А. Смена динамических режимов в популяциях видов с коротким жизненным циклом: результаты аналитического и численного исследования // Математическая биология и биоинформатика. 2014. Т. 9, № 2. С. 414–429.
- Фрисман Е. Я., Неверова Г. П., Кулаков М. П., Жигальский О. А. Явление мультирежимности в популяционной динамике животных с коротким жизненным циклом // Доклады РАН. — 2015. — Т. 460, № 4. — С. 488–493.

- Фрисман Е. Я., Ревуцкая О. Л., Неверова Г. П. Анализ популяционной динамики промысловых млекопитающих Среднего Приамурья России: математическое моделирование и оценка ресурсного потенциала // Биологические ресурсы Дальнего Востока: комплексный региональный проект ДВО РАН. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. — С. 184–202.
- Фрисман Е. Я., Ревуцкая О. Л. Оценка ресурсного потенциала охотничьих видов млекопитающих Среднего Приамурья России // Районирование территорий: принципы и методы. Монография / Под ред. Р. С. Кузнецовой, Г. С. Розенберга, С. В. Саксонова. — Тольятти: Анна, 2018. — С. 285–297.
- Фрисман Е. Я., Скалецкая Е. И. Странные аттракторы в простейших моделях динамики численности биологических популяций // Обозрение прикладной и промышленной математики. 1994. Т. 1, № 6. С. 988–1008.
- Четвериков С. С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // Журнал экспериментальной биологии. — 1926. — Т. 2. — С. 3–54.
- Шапиро А. П. К вопросу о циклах в возвратных последовательностях // Управление и информация. 1972. № 3. С. 96–118.
- Шапиро А. П. Роль плотностной регуляции в возникновении колебаний численности многовозрастной популяции // Исследования по математической популяционной экологии. — Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1983. — С. 3–17.
- Ashichmina E. V., Frisman E. Ya., Skaletskaya E. I., Kulikov A. N. Mathematical model for dynamics of the number of pelt products from the local population of Mantchurian squirrels // Ecol. Mod. — 1985. — Vol. 30. — P. 145–156.
- Axenovich T. I., Zorkoltseva I. V., Akberdin I. R., Beketov S. V., Kashtanov S. N., Zakharov I. A., Borodin P. M. Inheritance of litter size at birth in farmed arctic foxes (Alopex lagopus, Canidae, Carnivora) // Heredity. — 2007. — Vol. 98 (2). — P. 99–105.
- Darwin C. On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. — Oxford University Press, H. Milford, 1859.
- Feigenbaum M. J. Universal behavior in nonlinear systems // Phys. D: Nonlinear Phenomena. 1983. Vol. 7, No. 1–3. P. 16–39.
- Fisher R. A. The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon Press, 1930.
- Frisman E. Ya., Last E. V., Skaletskaya E. I. Population dynamics of harvested species with complex age structure (for Pacific salmons fish stocks as an example) // Ecological Modelling. — 2006. — Vol. 198. — P. 463–472.
- Frisman E. Y., Neverova G. P., Kulakov M. P. Change of dynamic regimes in the population of species with short life cycles: Results of an analytical and numerical study // Ecological Complexity. — 2016. — Vol. 27. — P. 2–11.
- Frisman E. Ya., Neverova G. P., Revutskaya O. L. Complex Dynamics of the Population with a Simple Age Structure // Ecological Modelling. 2011. Vol. 222. P. 1943–1950.
- Frisman E. Ya., Skaletskaya E. I., Kuzyn A. E. A mathematical model of the population dynamics of a local northern fur seal with seal herd // Ecological Modelling. — 1982. — Vol. 16. — P. 151–172.

- Haldane J. B. S. The causes of evolution. London: Longman reen, 1932.
- Hassell M. P. Density-dependence in single-species population // J. Animal. Ecol. 1975. Vol. 45, No. 1. P. 283–294.
- Malthus T. R. The works of Thomas Robert Malthus. London: Pickering & Chatto Publishers, 1986.
- May R. M. Biological population obeying difference equations: stable points, stable cycles, and chaos // J. Theor. Biol. 1975. Vol. 51, No. 2. P. 511–524.
- May R. M. Simple mathematical models with very complicated dynamics // Nature. 1976. Vol. 261. P. 459.
- Nedorezov L. V., Sadykova D. L. Dynamics of larch bud moth populations: application of Moran–Ricker models with time lag // Ecological Modelling. — 2015. — Vol. 297. — P. 26–32.
- Neverova G. P., Abakumov A. I., Yarovenko I. P., Frisman E. Ya. Mode change in the dynamics of exploited limited population with age structure // Nonlinear Dynamics. — 2018. — Vol. 94. — P. 827–844.
- Neverova G. P., Frisman E. Ya. Dynamic modes of population size and its genetic structure for species with nonoverlapping generations and stage development // Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation. 2021. Vol. 94. № 105554.
- Neverova G. P., Kulakov M. P, Frisman E. Ya. Changes in population dynamics regimes as result of both multistability and climatic fluctuation // Nonlinear dynamics. 2019. Vol. 97, No. 1. P. 107–122. DOI: 10.1007/s11071-019-04957-z.
- Neverova G. P., Yarovenko I. P., Frisman E. Y. Dynamics of populations with delayed density dependent birth rate regulation // Ecological Modelling. 2016. Vol. 340. P. 64–73.
- Neverova G. P., Zhdanova O. L., Bapan Ghosh, Frisman E. Ya. Dynamics of a dis-crete-time stage-structured predator-prey system with Holling type II response function // Nonlinear dynamics. — 2019. — Vol. 98, No. 1. — P. 427–446.
- Neverova G. P., Zhdanova O. L., Frisman E. Ya. Effects of natural selection by fertili-ty on the evolution of the dynamic modes of population number: Bistability and multistability // Nonlinear Dynamics. 2020. Vol. 101, No. 1. P. 687–709.
- Ricker W. E. Stock and recruitment // J. Fish. Res. Board Can. 1954. Vol. 11 (5). P. 559–623.
- Shapiro A. P., Frisman E. Ya., Skaletskaya E. I. Modelling dynamics and optimal exploitation of the population of the deer Cervus nippon // Ecological Modelling. — 1984. — Vol. 26. — P. 41–44.
- Verhulst P. La loi d'accroissement de la population // Nouv. Mem. Acad. Roy. Soc. Bellelettr. Bruxelles. — 1845. — Vol. 18, No. 1. — P. 1–38.
- Wright S. The genetical theory of natural selection: a review // J. Hered. 1930. Vol. 21. P. 340–356.
- Zhdanova O. L., Frisman E. Ya. Genetic polymorphism under cyclical selection in long-lived species: the complex effect of age structure and maternal selection // Journal of Theoretical Biology. — 2021. — Vol. 512. — P. 110564. — DOI: 10.1016/ j.jtbi.2020.110564.

Zhdanova O. L., Kuzin A. E., Skaletskay E. I., Frisman E. Ya. Why the population of the northern fur seals (Callorhinus ursinus) of Tyuleniy Island does not recover following the harvest ban: Analysis of 56 years of observation data // Ecological Modelling. — 2017. — Vol. 363. — P. 57–67.

Simple population models with complex dynamics: 50 years of researches at the Far East Scientific Center of the USSR Academy of Sciences and the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

E. Ya. Frisman¹, G. P. Neverova², O. L. Zhdanova²

¹ Institute for Complex Analysis of Regional Problems, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Birobidzhan, Russia
² Institute of Automation and Control Processes Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

An important step to understand the mechanisms causing population fluctuations was application of simple recurrent equations to studying and modeling of biological species dynamics with breeding season and development stages. Recurrent equations allow us to explain the population size fluctuations under relatively constant environmental conditions. Thus, we have received convincing model confirmation of the fact that periodic fluctuations observed in living systems can be determined not only by external influences, but also by the internal properties of the population system. This article presents the main results of modeling population dynamics that were obtained in the Russian Far East during the formation and development of an approach based on recurrent equations. The development of the scientific ideas of discrete time models, from the Malthus model to modern population models that take into account some factors affecting the structure and dynamics, is presented. We consider dynamic effects emerging due to density-dependent regulation, age, stage and genetic structures, and the influence of external factors. The revealed dynamic effects allow us to describe and analyze some phenomena observed in nature, for example, the appearance and disappearance of fluctuations within a population and the genetic differentiation of individuals. Special attention is paid to applying recurrent models to the analysis and description of natural population dynamics. Note that within the framework of this field, a mathematical model was written for a specific biological species with taking into account features of its life cycle. For example, when analyzing and modeling the dynamics of commercial harvesting from local populations of the Manchu squirrel Sciurus vulgaris mantchuricus, the species abundance dependence on the pine nut yield as its main food was considered. When modeling the herd dynamics of deer Cervus nippon and the northern fur seal Callorhinus ursinus, age-sex structure of the species was necessary to take into account, which allows us to successfully solve the problems of optimal management of deer and fur seal populations. Here we also discuss some prospects of development in applying discrete-time approach to modeling population dynamics.

Keywords: population dynamics, mathematical modeling, recurrent equations, age structure, ecological genetic models, multistability and multimode.

Научное издание

Горизонты биофизики

Том 2

Под редакцией академика А. Б. Рубина

Дизайнер А. А. Гурьянова Технический редактор А. В. Бакиев Корректор А. В. Бекмачева

Подписано в печать 23.09.2022. Формат 70×100 ¹/₁₆. Усл. печ. л. 30,69. Уч.-изд. л. 32,12. Гарнитура «Таймс». Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Тираж 300 экз. Заказ № 22-31.

АНО «Ижевский институт компьютерных исследований», 426053, г. Ижевск, ул. Ворошилова, д. 123. http://shop.rcd.ru E-mail: mail@rcd.ru Тел./факс: +7 (3412) 50-02-95

Отпечатано в цифровой типографии АНО «Ижевский институт компьютерных исследований».