

УДК 577.345

## АДАПТАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИНТЕЗА В КЛЕТКАХ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* К ДЕЙСТВИЮ КАДМИЯ: АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ

© 2024 г. А.А. Волгушева\*, И.В. Конюхов\*, Т.К. Антал\*\*, #

\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

\*\*Лаборатория комплексных экологических исследований Псковского государственного университета, Красноармейская ул., 1, Псков, 180000, Россия

#E-mail: taras\_an@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Исследованы механизмы адаптации первичных реакций фотосинтеза у зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* к действию кадмия путем изучения динамики распределения ключевых показателей фотосинтеза в популяции клеток. Синхронную культуру микроводорослей инкубировали в течение 96 ч в присутствии 25 мкМ кадмия и регистрировали ОЖР-кривые у индивидуальных клеток на разных этапах инкубации с токсикантом с помощью оригинального микрофлуориметра. Анализ ОЖР-кривых позволил определить распределение среди клеток ключевых параметров ЖР-теста:  $F_v/F_m$ ,  $ET_0/ABS$ ,  $RC/ABS$ , которые характеризуют фотохимическую активность ФС II, электронный транспорт в ФС II и поглощение света активным центром ФС II. Адаптация первичных реакций фотосинтеза микроводорослей к действию кадмия сопровождалась появлением в культуре двух сравнимых по вкладу фракций клеток, которые сохраняли стабильность фотосинтетических характеристик в условиях индуцированного токсикантом нарушения энергетического баланса. Клетки первой фракции сохраняли умеренную активность ФС II за счет уменьшения размера антенны ФС II, в то время как клетки второй фракции обладали низкой фотохимической активностью ФС II, сохраняя размер антенны близкий контрольным клеткам.

*Ключевые слова:* флуоресценция хлорофилла, микрофлуориметрия, фотосинтез, микроводоросли, адаптация, кадмий.

DOI: 10.31857/S0006302924030063, EDN: OFWPXY

Внутрипопуляционная вариабельность клеток различных микроорганизмов является важным адаптационным механизмом, позволяющим увеличить шансы на выживание в условиях действия неблагоприятных факторов, в том числе при токсическом стрессе [1, 2]. Большинство современных исследований, направленных на изучение адаптационных механизмов микроводорослей, основываются на анализе данных, полученных на суспензионных культурах, то есть используются усредненные значения по популяции. В то же время роль изменений структуры популяции в ответ на стресс изучена в меньшей степени, в том числе из-за сложности регистрации параметров состояния отдельной клетки.

Вариабельность клеток микроорганизмов широко распространена в природе. В частности, в микробных колониях хорошо изучена неоднородность морфологических и метаболических характеристик клеток [3]. У зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* выявлены различия между клетками по скорости роста и деления [4]. Выявлены различия в физиологии, метаболизме и морфологии между отдельными клетками разных видов водорослей в условиях недостатка биогенных элементов [5]. Ранее нами показано, что в популяции *Chlorella sorokiniana* при действии токсиканта 2,3',4,4',6-пентахлорбифенила выживает только 2–3% клеток, которые обладают высокой устойчивостью фотосинтеза к данному веществу [6].

Фотосинтетическая активность является одним из ключевых индикаторов физиологического состояния фототрофов и широко используется

Сокращения: ФХ – флуоресценция хлорофилла, ППФ – плотность потока фотонов.

при изучении ответных реакций организма на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Одними из наиболее быстрых и информативных подходов к изучению первичных реакций фотосинтеза являются методы регистрации флуоресценции хлорофилла (ФХ), в том числе кривых световой индукции ФХ (так называемых ОЖР-кривых). Типичная ОЖР-кривая представляет собой индуцированную вспышкой света высокой интенсивности кинетическую кривую роста выхода ФХ от минимального значения  $F_O$  (точка O) у адаптированного к темноте образца с окисленным состоянием переносчиков электронов фотосинтетической электрон-транспортной цепи до максимального уровня  $F_M$  (пик P), когда электрон-транспортная цепь переходит в полностью восстановленное состояние. На такой кривой обычно наблюдаются три фазы роста выхода ФХ: OJ (от 5–40 мкс до 2–3 мс), JI (от 2–3 мс до 20–30 мс) и IP (от 20–30 мс до 100–200 мс), которые обусловлены тремя последовательными процессами восстановления электрон-транспортной цепи. OJ-фаза (так называемая фотохимическая фаза) зависит от интенсивности возбуждающего света и отражает частичное восстановление акцепторной стороны ФС II, а именно, хинонных акцепторов  $Q_A$  (в большей степени) и  $Q_B$  (в меньшей степени) [7]. Считается, что последующие за точкой J фазы JI и IP обусловлены дополнительным восстановлением акцепторной стороны ФС II, увеличением энергизации тилакоидных мембран и конформационными изменениями ФС II [8–10]. Для анализа ОЖР-кривой часто используется JIP-тест [11, 12], позволяющий оценивать процессы преобразования световой энергии и эффективность первичных реакций фотосинтеза.

В настоящей работе исследовали механизмы адаптации культуры *C. reinhardtii* к токсическому действию одного из наиболее актуальных промышленных токсикантов – кадмия – путем анализа распределения ключевых показателей фотосинтетической активности в популяции клеток. В целом, механизмы токсического действия данного токсиканта на первичные реакции фотосинтеза хорошо изучены на высших растениях и микроводорослях [13, 14], однако влияние кадмия на гетерогенность популяции микроводорослей остается малоизученным.

В данной работе гетерогенность популяции *C. reinhardtii* изучали путем анализа ОЖР-кривых, измеренных на индивидуальных водорослевых клетках с помощью оригинального микрофлуориметра, разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ [15]. Необходимо отметить, что микрофлуориметрический метод ранее использовали, в основном, для анализа распределения параметра JIP-теста  $F_V/F_M$ , отра-

жающего фотохимическую активность ФС II, в популяции микроводорослей [16, 17]. Этот параметр связан с самым первым (фотохимическим) этапом преобразования энергии в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Однако анализ ОЖР-кривых позволяет определять и другие важные показатели первичных реакций фотосинтеза.

Ранее нами было показано, что форма кинетической кривой ОЖР индивидуальной водорослевой клетки, измеренной с помощью оригинального микрофлуориметра, соответствует типичной кривой, измеренной в суспензии микроводорослей с помощью стандартных флуориметров, таких как РЕА и МРЕА (Hansatech, Великобритания) [18]. Однако кривая индивидуальной клетки характеризуется рядом особенностей, обусловленных использованием очень высокой интенсивности возбуждающего света в микрофлуориметре: плотность потока фотонов (ППФ) 15000 мкмоль фотонов  $m^{-2} c^{-1}$ , в то время как в стандартном флуориметре ППФ обычно составляет 3000 – 5000 мкмоль фотонов  $m^{-2} c^{-1}$ . Необходимость использования такой высокой интенсивности света в микрофлуориметре связана с тем, что сигнал ФХ от индивидуальной клетки очень мал, и его регистрация сопровождается существенным вкладом шумовой компоненты. Поскольку выход ФХ пропорционален интенсивности возбуждающего света, то повышение интенсивности света сопровождается увеличением выхода ФХ и, соответственно, ростом отношения сигнал/шум. К характерным особенностям ОЖР-кривой индивидуальной клетки относятся: высокая скорость начального роста выхода ФХ (фаза OJ) и занижение величины пика P ( $F_M$ ) вследствие раннего развития процессов нефотохимического тушения [18].

В нашей работе путем анализа ОЖР-кривых индивидуальных клеток *C. reinhardtii* оценивали внутривидовое распределение следующих ключевых характеристик первичных реакций фотосинтеза: максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС II ( $F_V/F_M$ ), квантового выхода электронного транспорта ( $ET_O/ABS$ ) и отношения активных реакционных центров к поглощенному свету ( $RC/ABS$ ). Полученные результаты указывают на то, что адаптация первичных реакций фотосинтеза у *C. reinhardtii* к действию кадмия на уровне структуры популяции сопровождается появлением разных типов клеток со специфическими свойствами ФС II, которые определяют устойчивость фотосинтеза к условиям энергетического дисбаланса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование микроводорослей.** В качестве объекта исследования использовали синхронную культуру *Chlamydomonas reinhardtii*, выращенную на минеральной среде HS [19]. Культуры растили в течение 72 ч до концентрации ~3 мкг хлорофилла·мл<sup>-1</sup> в конических колбах Эрленмейера объемом 100 мл на шейкере при скорости перемешивания 120 об. мин<sup>-1</sup> и температуре 25°C. Использовался следующий режим периодического освещения: 10 ч свет (люминесцентные лампы, плотность потока фотонов (ППФ) 100 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>), 14 ч темнота.

Полученную синхронную культуру разливали в колбы Эрленмейера объемом 50 мл и добавляли кадмий (в виде CdSO<sub>4</sub>) в конечной концентрации 25 мкМ. Ранее нами было показано, что схожая концентрация кадмия индуцирует долгосрочные изменения, обусловленные процессами адаптации и фотодеструкции первичных реакций фотосинтеза в культурах микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella sorokiniana* [14]. Затем контрольные и обработанные клетки помещали на постоянный свет (ППФ 40 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>) и инкубировали в течение 72 ч на шейкере при скорости перемешивания 120 об. мин<sup>-1</sup> и температуре 25°C.

**Регистрация ОЛР-кривых.** ОЛР-кривые регистрировали на индивидуальных клетках *C. reinhardtii* с помощью разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова микрофлуориметра, как описано ранее [15]. Источником возбуждения ФХ служил синий свет светодиодного источника с максимумом полосы излучения 445 нм и ППФ 15000 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Перед измерением ФХ в суспензию клеток добавляли этанол в конечной концентрации 0.3% для обездвиживания клеток, после чего выдерживали образец в темноте в течение 5 мин. Затем образец с клетками помещали в камеру Горяева и проводили измерения с помощью микрофлуориметра, настраивая фокус на отдельную клетку. На индивидуальной клетке последовательно регистрировали минимум 10 индукционных кривых каждая длительностью 200 мс с темновым периодом между измерениями 20 с, после чего кривые усредняли. Технические повторности проводили для накопления сигнала и повышения отношения сигнал/шум на ОЛР-кривых.

**Анализ ОЛР-кривых.** Для анализа ОЛР-кривых использовали ЛР-тест [11]. Сначала определяли следующие характеристические точки на ОЛР-кривых:

– интенсивность ФХ при 20 мкс ( $F_0$ ), 300 мкс ( $F_{300 \text{ мкс}}$ ), 2 мс ( $F_J$ ), 20 мс ( $F_I$ );

– величину максимального выхода ФХ на ОЛР-кривой ( $F_M$ ).

Затем полученные результаты использовали для расчета следующих избранных параметров ЛР-теста:

1) максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС II ( $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ );

2) квантового выхода электронного транспорта ( $ET_0/ABS = F_V/F_M \times (1 - V_J)$ ), где  $V_J = (F_J - F_0)/F_M$ ;

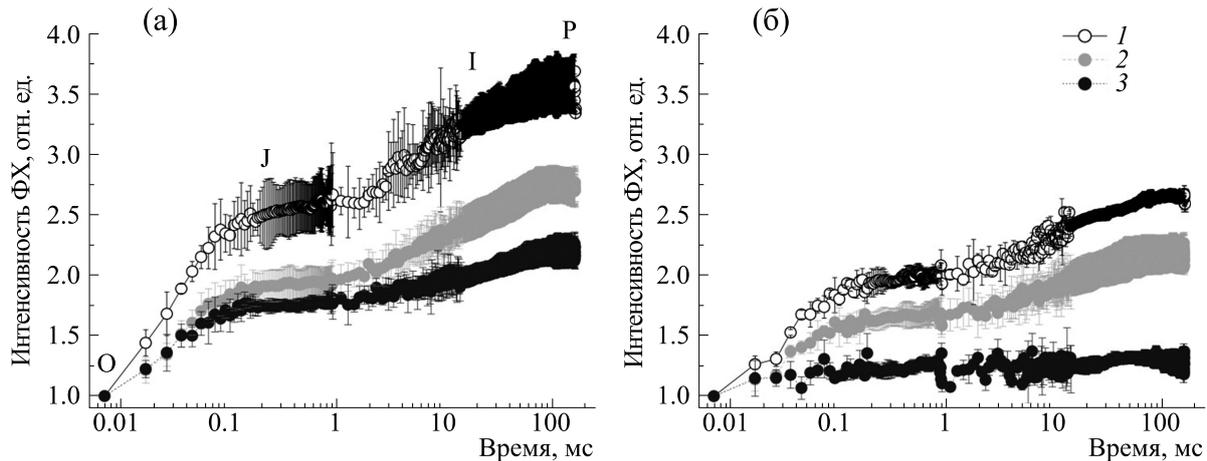
3) отношения активных реакционных центров к поглощенному свету ( $RC/ABS = [(F_{2 \text{ мкс}} - F_0)/(4 \times (F_{300 \text{ мкс}} - F_0))] \times (F_V/F_M)$ ).

**Статистический анализ.** Представленные результаты (ОЛР-кривые) получены в 3 биологических повторностях, каждая из которых являлась результатом усреднения минимум 10 технических повторностей. Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One way ANOVA) и параметрического критерия Тьюки (Tukey test). Различия между показателями при  $p < 0.05$  считали статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены типичные ОЛР-кривые индивидуальных клеток *C. reinhardtii*, полученные в культурах до обработки (рис. 1а, 0 ч) и через 72 ч после обработки 25 мкМ кадмия (рис. 1б). Видно, что кривые в клетках контрольной культуры характеризовались типичной формой с тремя фазами роста ФХ: ОJ, JI и IP. Нормировка сигнала ФХ на  $F_0$  в контроле выявила статистически достоверную вариабельность ОЛР-кривых по величине переменной флуоресценции ( $F_V/F_0$ ) (три типа кривых, рис. 1а). При этом форма ОЛР-кривых характеризовалась стабильностью и слабо изменялась внутри контрольной популяции клеток. Этот результат свидетельствует о том, что клетки в культуре, выращенной в условиях, близких к оптимальным для фотосинтеза, различались по величине фотохимической активности ФС II.

Более выраженные различия между ОЛР-кривыми индивидуальных клеток наблюдались через 72 ч инкубации *C. reinhardtii* в присутствии кадмия (рис. 1б). При этом ожидаемо наблюдалось снижение общего выхода величины  $F_V/F_0$  по сравнению с контролем, а также возрастала вариабельность кривых по величине  $F_V/F_0$ . Так, в обработанной культуре одновременно присутствовали клетки с величиной  $F_V/F_0$  как в контроле (рис. 1а) и клетки с практически отсутствующей переменной ФХ, что свидетельствует об очень



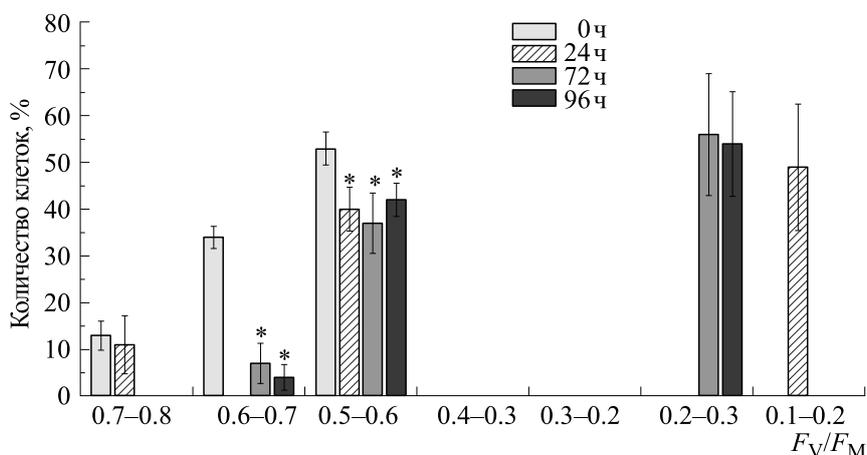
**Рис. 1.** Типичные ОЖР-кривые индивидуальных клеток *C. reinhardtii* в 0 ч (а) и через 72 ч инкубации (б) в присутствии 25 мкМ Cd; 1, 2, 3 – кривые представляют фракции клеток с разной фотохимической активностью. Кривые нормированы на величину  $F_0$ .

низкой фотохимической активности ФС II. Для более детального анализа влияния кадмия на гетерогенность популяции *C. reinhardtii* по показателям первичных реакций фотосинтеза мы исследовали динамику распределения в популяции ключевых параметров JIP-теста:  $F_V/F_M$ ,  $ET_0/ABS$ ,  $RC/ABS$ , рассчитанных из ОЖР-кривых индивидуальных клеток.

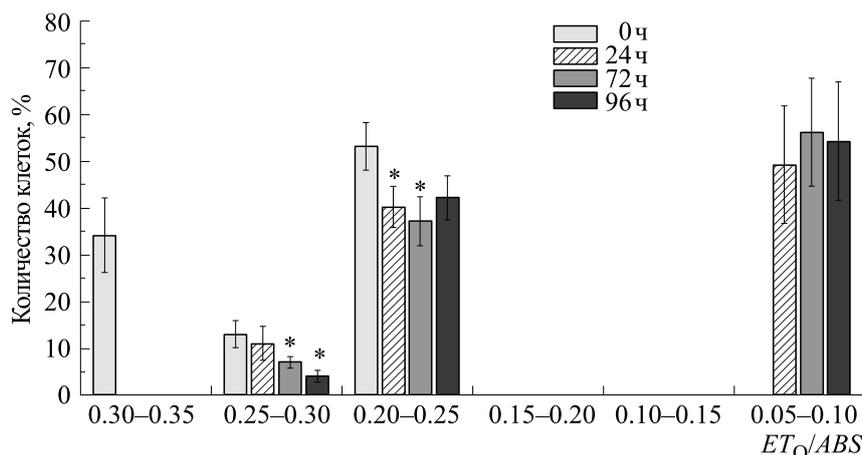
На рис. 2 показано влияние кадмия на распределение величины параметра  $F_V/F_M$  среди клеток культуры *C. reinhardtii*. На начальной стадии эксперимента (0 ч, до добавления кадмия) величина  $F_V/F_M$  варьировала от 0.5 до 0.8, при этом примерно половина клеток (53%) характеризовалась значениями  $F_V/F_M$  в интервале 0.5–0.6, а остальные клетки показывали более высокие значения.

Данный результат свидетельствует о достаточно высокой гетерогенности контрольной культуры микроводорослей по величине фотохимической активности ФС II. Несколько заниженные значения фотохимической активности ФС II от ожидаемых обусловлены особенностями метода регистрации ОЖР-кривых индивидуальных клеток как упоминалось выше. Так, в оптимальных условиях роста микроводорослей величина  $F_V/F_M$ , измеренная в суспензии клеток *C. reinhardtii* стандартными методами, составляет ~0.7.

Под влиянием кадмия наблюдалось резкое увеличение гетерогенности культуры *C. reinhardtii* по величине  $F_V/F_M$ , сопровождавшееся появлением фракций клеток с низкими значениями этого параметра (в интервале 0.1–0.3) (рис. 2). Через 24 ч токсического действия практически у поло-



**Рис. 2.** Распределение величины  $F_V/F_M$  среди клеток культуры *C. reinhardtii* в 0, 24, 72 и 96 ч инкубации в присутствии 25 мкМ Cd. Выборка для каждого времени измерения составляла не менее 100 клеток. \* – Достоверные различия величины  $F_V/F_M$  у обработанных кадмием (24, 72 и 96 ч) по сравнению с необработанными (0 ч) клетками.



**Рис. 3.** Распределение величины  $ET_0/ABS$  среди клеток культуры *C. reinhardtii* в 0, 24, 72, 96 ч инкубации в присутствии 25 мкМ Cd. Выборка для каждого времени измерения составляла не менее 100 клеток. \* — Достоверные различия величины  $ET_0/ABS$  у обработанных кадмием (24, 72 и 96 ч) по сравнению с необработанными (0 ч) клетками.

вины клеток в популяции наблюдались очень низкие значения  $F_V/F_M$  (0.1–0.2), в то время как примерно 10% клеток сохраняли максимальные значения  $F_V/F_M$  ( $> 0.7$ ). Очевидно, что фракция клеток с высокой фотохимической активностью ФС II характеризуется в целом высокой толерантностью к кадмию. Более длительная инкубация с токсикантом (до 96 ч) приводила к стабильному преобладанию двух типов клеток со значениями  $F_V/F_M$  в интервалах 0.5–0.6 и 0.2–0.3. Этот результат указывает на некоторое снижение гетерогенности популяции клеток по фотохимической активности по сравнению с начальной стадией действия кадмия (24 ч). Практически одинаковое распределение величины  $F_V/F_M$  на поздних стадиях эксперимента (72 и 96 ч) свидетельствует об отсутствии значительных изменений в структуре популяции по величине фотохимической активности ФС II, скорее всего вследствие частичной адаптации фотосинтетического аппарата к токсическому стрессу.

Параметр  $ET_0/ABS$  (активность электронного транспорта) является более комплексным по сравнению с  $F_V/F_M$ , поскольку характеризует два последовательных первичных процесса фотосинтеза: фотохимическое преобразование энергии в ФС II (способность к восстановлению  $Q_A$ ) и способность к переносу электрона с  $Q_A$  ФС II в пластохиноновый пул [11]. В отличие от параметра  $F_V/F_M$ , который может быть измерен с помощью различных технических подходов и поэтому получил широкое распространение [20–22],  $ET_0/ABS$  можно корректно оценить только из ОЖР-кривых.  $ET_0/ABS$  эмпирически и теоретически обоснован и может рассматриваться в каче-

стве одного из ключевых параметров ЖР-теста [7].

Влияние кадмия на распределение величины  $ET_0/ABS$  среди клеток культуры *C. reinhardtii* показано на рис. 3. До обработки клеток (0 ч) величина  $ET_0/ABS$  варьировала в диапазоне 0.2–0.3, при этом распределение клеток по данному параметру было сходным с распределением  $F_V/F_M$  в 0 ч (рис. 2), указывая на то, что распределение  $ET_0/ABS$  в контрольной культуре определялось, в основном, распределением  $F_V/F_M$ . Инкубация с токсикантом в течение 24 ч приводила к появлению двух основных фракций клеток: с величиной  $ET_0/ABS$  в интервалах 0.20–0.25 (40%) и 0.05–0.10 (50%). При этом сохранялась незначительная фракция клеток (10%) с высокой величиной  $ET_0/ABS$  (0.25–0.30). Более длительная инкубация культуры (72 и 96 ч) существенно не изменяла распределение клеток, наблюдаемое в 24 ч, при этом характер распределения  $ET_0/ABS$  в интервале 72–96 ч походил на таковой для  $F_V/F_M$  (рис. 2). Таким образом, изменения активности электронного транспорта при действии кадмия в целом определялись изменениями фотохимической активности ФС II, и, соответственно, компонент, связанный с электронным транспортом с ФС II в пластохиноновый пул, не изменялся значительно в наших экспериментальных условиях. Динамика распределения активности электронного транспорта среди клеток *C. reinhardtii* в присутствии кадмия характеризовалась большей стабильностью по сравнению с фотохимической активностью ФС II, поскольку основные изменения происходили в течение первых 24 ч, а затем носили минорный характер.

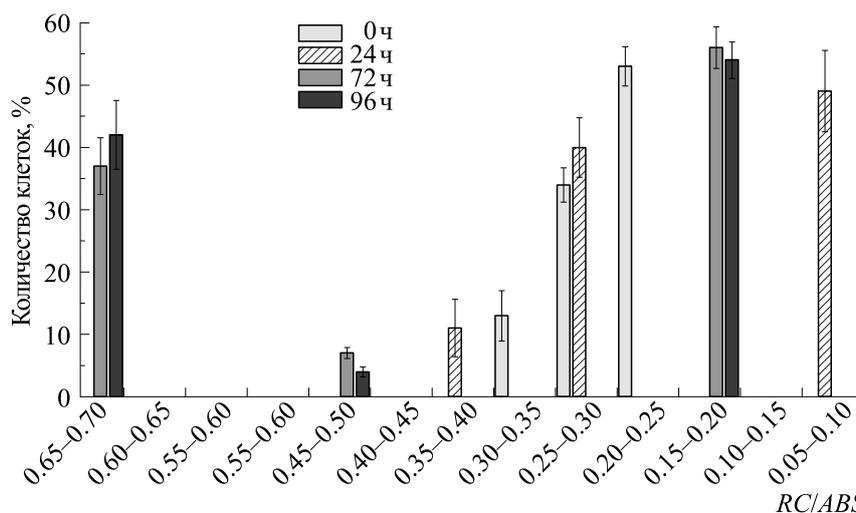


Рис. 4. Распределение величины  $RC/ABS$  среди клеток культуры *C. reinhardtii* в 0, 24, 72, 96 ч инкубации в присутствии 25 мкМ Cd. Выборка для каждого времени измерения составляла не менее 100 клеток.

Параметр  $RC/ABS$  также является важной характеристикой первичных реакций фотосинтеза, отражая количество фотохимически активных центров ФС II, нормированных на светопоглощение, которое пропорционально содержанию фотосинтетических пигментов. Считается, что обратная величина (параметр  $ABS/RC$ ) отражает размер светособирающей антенны активного центра ФС II.

Распределение  $RC/ABS$  среди клеток *C. reinhardtii* в присутствии кадмия показано на рис. 4. В течение всего периода инкубации микроводорослей наблюдали изменения значений данного параметра в широком диапазоне: от 0.05 до 0.70. В культуре до добавления кадмия (0 ч) величина  $RC/ABS$  у клеток варьировала в интервале 0.20–0.35, при этом более половины клеток характеризовались значениями в узком диапазоне значений: от 0.20 до 0.25. Воздействие токсиканта в течение 24 ч приводило к появлению фракции клеток (около 50%) с низкими значениями  $RC/ABS$  в интервале 0.05–0.10. Сопоставление этих изменений с изменениями  $F_V/F_M$  (рис. 2) указывает на то, что основной причиной снижения величины  $RC/ABS$  через 24 ч инкубации является подавление фотохимической активности центров ФС II у значительной части водорослевых клеток. Инкубация культуры в присутствии кадмия в течение 72 и 96 ч сопровождалась появлением двух доминирующих фракций клеток со значениями  $RC/ABS$  в достаточно узких интервалах: 0.15–0.20 (~40%) и 0.65–0.70 (~55%). Очевидно, что появление клеток с высокими значениями  $RC/ABS$  (в два-три раза выше, чем в контрольных клетках) обусловлено снижением светопоглощения вследствие снижения содержания фотосинтетических пигментов, в первую очередь, хлорофилла в клет-

ках. Распределение  $RC/ABS$  в интервале инкубации от 72 до 96 ч практически не изменялось, указывая на стабильное соотношение между активными реакционными центрами и поглощенным светом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кадмий индуцирует снижение размера светособирающей антенны активного центра ФС II у значительного количества обработанных клеток. Действительно, ранее было показано, что действие кадмия на фотосинтетический аппарат *C. reinhardtii* сопровождается общим снижением содержания хлорофилла в клетках и размера светособирающей антенны ФС II [23].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные высокочувствительные методы измерения ФХ предоставляют перспективную возможность измерения ОЖР-кривых на индивидуальных водорослевых клетках, что позволяет исследовать механизмы адаптации микроводорослей к стрессовым воздействиям, связанные с реорганизацией структуры популяции клеток. В представленном исследовании мы впервые охарактеризовали влияние кадмия на гетерогенность культуры *C. reinhardtii* путем измерения и анализа кинетических кривых ФХ индивидуальных клеток. Анализ кривых проводили путем расчета ключевых параметров ЖР-теста:  $F_V/F_M$ ,  $ET_O/ABS$  и  $RC/ABS$ . Нами показано, что адаптация культуры *C. reinhardtii* к токсическому действию сопровождается появлением нескольких типов клеток:

1) клеток с умеренной и низкой фотохимической активностью ( $F_V/F_M$  в интервалах 0.5–0.6 (~40% от общего числа) и 0.2–0.3 (~55% соответственно);

2) клеток с высоким и низким отношением фотохимически активных центров ФС II к поглощенному свету (RC/ABS в интервалах 0.65–0.70 (~40%) и 0.15–0.20 (~55%) соответственно).

Сопоставление распределения  $F_V/F_M$  и RC/ABS позволяет сделать вывод о том, что через 72 ч инкубации *C. reinhardtii* в присутствии кадмия формируются две стабильные и сравнимые по вкладу фракции клеток. Клетки первого типа, доля которых составляет около 40% от общего числа, характеризуются умеренной фотохимической активностью и малым размером антенны ФС II, в то время как клетки второго типа с долей около 55% обладают низкой фотохимической активностью и характерным для контрольных клеток размером антенны ФС II.

Таким образом, изменения первичных реакций фотосинтеза в клетках *C. reinhardtii* под действием кадмия протекают наиболее вероятно по двум возможным путям. Первый путь предполагает сохранение умеренной активности ФС II в клетке за счет уменьшения размера светособирающей антенны на активный центр ФС II. Так, малый размер антенны ФС II снижает избыточное возбуждение реакционных центров в условиях дисбаланса между поглощением и потреблением энергии в процессах фотосинтеза, индуцированного кадмием. Таким образом, снижается образование активных форм кислорода в ФС II и, соответственно, фотодеструкция ФС II. Второй путь обусловлен переходом ФС II в малоактивное состояние (с активностью менее 25% от контрольного уровня), в котором ФС II также сохраняет устойчивость к деструктивным реакциям. Дальнейшее изучение феномена множественности путей адаптации клеток микроводорослей к стрессовому воздействию должно включать изучение механизмов запуска («выбора» клеткой) того или иного адаптационного механизма на ранних стадиях токсического стресса.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00353).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Магданова Л. А. и Голясная Н. В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. *Микробиология*, **82** (1), 3–13 (2013). DOI: 10.7868/S0026365613010072
2. Wang X. and Wang W. X. Cell cycle-dependent Cu uptake explained the heterogenous responses of *Chlamydomonas* to Cu exposure. *Environ. Pollut.*, **319**, 121013 (2023). DOI: 10.1016/j.envpol.2023.121013
3. Altschuler S. J. and Wu L. F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell*, **141** (4), 559–563 (2010). DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.033
4. Damodaran S. P., Eberhard S., Boitard L., Rodriguez J. G., Wang Y., Bremond N., Baudry J., Biette J., and Wollman F. A. A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One*, **10** (3), e0118987 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0118987
5. Yan P., Guo J. S., Zhang P., Xiao Y., Li Z., Zhang S. Q., Zhang Y. X., and He S. X. The role of morphological changes in algae adaptation to nutrient stress at the single-cell level. *Sci. Total Environ.*, **754**, 142076 (2021). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142076
6. Volgusheva A. A., Todorenko D. A., Konyukhov I. V., Voronova E. N., Pogosyan S. I., Plyusnina T. Y., Khruschev S. S., and Antal T. K. Acclimation Response of Green Microalgae *Chlorella Sorokiniana* to 2,3',4,4',6-Pentachlorobiphenyl. *Photochem. Photobiol.*, **99** (4), 1106–1114. (2023). DOI: 10.1111/php.13771
7. Schansker G., Tóth S. Z., Kovács L., Holzwarth A. R., Garab G. Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll a fluorescence rise. *Biochim. Biophys. Acta*, **1807** (9), 1032–43 (2011). DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.05.022
8. Vredenberg W. J., Bulychev A. Photoelectric effects on chlorophyll fluorescence of photosystem II *in vivo*. Kinetics in the absence and presence of valinomycin. *Bioelectrochemistry*, **60** (1–2), 87–95 (2003). DOI: 10.1016/s1567-5394(03)00053-7
9. Stirbet A. and Govindjee. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth. Res.*, **113** (1–3), 15–61 (2012). DOI: 10.1007/s11120-012-9754-5
10. Sipka G. B., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J. R., Lambrev P. H., and Garab G. Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center. *Plant Cell*, **33** (4), 1286–1302 (2021). DOI: 10.1093/plcell/koab008
11. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., and Srivastava A. In *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*, Eds. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), p. 321. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9\_12
12. Lazár D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light.

- Funct. Plant Biol.*, **33** (1), 9–30 (2006). DOI: 10.1071/FP05095
13. Todorenko D., Volgusheva A., Timofeev N., Kovalenko I., Matorin D., and Antal T. Multiple *in vivo* Effects of cadmium on photosynthetic electron transport in pea plants. *Photochem. Photobiol.*, **97** (6), 1516–1526 (2021). DOI: 10.1111/php.13469
  14. Volgusheva A., Todorenko D., Baizhumanov A., Chivkunova O., Solovchenko A., and Antal T. Cadmium- and chromium-induced damage and acclimation mechanisms in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.*, **34**, 1435–1446 (2022). DOI: 10.1007/s10811-022-02747-6
  15. Kuznetsov A. G., Konyukhov I. V., Pogosyan S. I., and Rubin A. B. Microfluorimeter for studying the state of photosynthetic apparatus of individual cells of microalgae *Oceanology*, **61** (6), 1055–1063 (2021). DOI: 10.1134/S0001437021060278
  16. Погосян С. И., Сивченко М. А. и Максимов В. Н. Физиологическая гетерогенность популяции микроводорослей. Классификация цинобиев *Scenedesmus quadricauda* по типам кривых индукции флуоресценции хлорофилла. *Изв. РАН. Сер. биол.*, **3**, 337–373 (1996).
  17. Voronova E. N., Il'ash L.V., Pogosyan S. I., Ulanova A. Yu., Matorin D. N., Man-gi Cho, and Rubin A. B. Intrapopulation heterogeneity of the fluorescence parameters of the marine plankton alga *Thalassiosira weissflogii* at various nitrogen levels. *Microbiology*, **78**, 419–427 (2009). DOI: 10.1134/S0026261709040043
  18. Волгушева А. А., Конюхов И. В. и Антал Т. К. Оценка первичных реакций фотосинтеза в индивидуальных клетках микроводорослей микрофлуориметрическим методом. *Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология*, **78** (3), 170–177 (2023). DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-4
  19. Harris E. H. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Ed. by E. H. Harris (Academic Press, San Diego, 1989). DOI:10.1126/science.246.4936.1503-a
  20. Маторин Д. Н., Осипов В. А., Яковлева О. В. и Погосян С. И. *Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла* (МАКС Пресс, Москва, 2010)
  21. Маторин Д. Н. и Рубин А. Б. *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей* (Ижевский институт компьютерных исследований, Ижевск-Москва, 2012).
  22. Маторин Д. Н. и Горячев С. Н. *Флуоресценция хлорофилла микроводорослей в биотестировании загрязнений* (Альтекс, Москва, 2017).
  23. Thiriet-Rupert S., Gain G., Jadoul A., Vigneron A., Bosman B., Carnol M., Motte P., Cardol P., Nouet C., and Hanikenne M. Long-term acclimation to cadmium exposure reveals extensive phenotypic plasticity in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.*, **187** (3), 1653–1678 (2021). DOI: 10.1093/plphys/kiab375

## Acclimation of Primary Photosynthetic Reactions in the Cells of *Chlamydomonas reinhardtii* to Cadmium: Analysis of Cell Population Heterogeneity

A.A. Volgusheva\*, I.V. Konyukhov\*, and T.K. Antal\*\*

\*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

\*\*Laboratory of Integrated Environmental Research, Pskov State University, Krasnoarmeyskaya ul. 1, Pskov, 180000 Russia

The mechanisms of acclimation of primary photosynthetic reactions in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* to the toxic action of cadmium were investigated by analyzing the dynamics of distribution of key photosynthetic parameters in cell population. A synchronous culture of microalgae was incubated for 96 h in the presence of 25  $\mu\text{M}$  Cd, and OJIP-transient curves of individual cells were recorded at different stages of incubation with the toxicant using an original microfluorometer. The analysis of OJIP-transient curves made it possible to determine distributions of key JIP-test parameters:  $F_V/F_M$ ,  $ET_O/ABS$ ,  $RC/ABS$ , which represent photochemical activity of PS II, electron transport in PS II, and light absorption per active reaction center in PS II, respectively. Acclimation of primary photosynthetic reactions in microalgae to cadmium was accompanied by the appearance of two dominating cell fractions, which demonstrated the stable values of photosynthetic parameters when energy imbalance occurred due to the presence of the toxicant. The cells related to the first fraction retained moderate PS II activity by the effect of reduced PS II antenna size, while the cells of the second fraction showed low photochemical activity of PS II keeping antenna size similar to those of control cells.

*Keywords:* chlorophyll fluorescence, microfluorometry, photosynthesis, microalgae, acclimation, cadmium