

Лаборатория молекулярной спектроскопии

Состав лаборатории:

Проскуряков Иван Игоревич, заведующий лабораторией, доктор физ.-мат. наук

Кленина Ирина Борисовна, старший научный сотрудник, кандидат физ.-мат. наук

Кузьмин Александр Николаевич, ведущий инженер-исследователь

Маслов Александр Иванович, научный сотрудник, кандидат биологических наук

Павлова Елена Алексеевна, научный сотрудник, кандидат биологических наук

Поздняков Никита Валентинович, младший научный сотрудник

Трубецкой Олег Анатольевич, ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук

Лаборатория имеет в своем распоряжении:

1. Спектрометр ЭПР EMX-6/1 фирмы Bruker (Германия) X-диапазона, снабженный прецизионно термостатируемым ($+12 - +90 \pm 0,1$ °C) прямоугольным резонатором, сверхчувствительным цилиндрическим резонатором и резонатором для работы в параллельной моде. Укомплектован системой криостатирования Oxford Instruments (2.8 – 300 K)

2. Спектрометр ЭПР (home-made) X-диапазона, снабжен цилиндрическим резонатором с отверстием для ввода света. Оборудован системой прецизионного измерения g-факторов (± 0.0001), системой криостатирования Oxford Instruments (2.8 – 300 K), системой цифровой развертки магнитного поля и сбора информации (записи сигнала ЭПР)

Имеет режим измерения фотоиндуцированных сигналов с временным разрешением 50 нсек. Возбуждение образцов при этом производится вспышкой лазера с перестраиваемой длиной волны (410 – 2500 нм).

Имеется возможность проведения чувствительных измерений при мощностях СВЧ менее 1 мкВт, т.е. при чрезвычайно низкой индуцированной релаксации

3. Масс-спектрометр Delta V Advantage (Thermo Fischer Scientific, Германия) для изотопных измерений N₂, CO, NO, O₂, CO₂, N₂O и SO₂, с порогом чувствительности 10 пикограмм
4. Пламенный АА - спектрометр PerkinElmer AAnalyst 400
5. Установку оптического флеш-фотолиза субмикросекундного временного разрешения с возможностью проведения измерений в постоянном магнитном поле от 0 до 5 кГс
6. Установку магнитооптической дифференциальной спектрофотометрии

Основные направления научной деятельности:

1. Первичные процессы переноса энергии и электронов при фотосинтезе.

Механизмы первичного преобразования энергии при фотосинтезе привлекают внимание ученых всего мира из-за своей чрезвычайно высокой эффективности (квантовый выход, близкий к 1). В Лаборатории работа в данном направлении проводится преимущественно с применением метода ЭПР и изучения эффектов магнитных полей. Поскольку промежуточные стадии преобразования энергии света как правило являются короткоживущими, то применение находит метод ЭПР высокого временного разрешения (ВР-ЭПР, с разрешением около 50 нс). Основное внимание на этом направлении уделяется изучению свойств радикальных пар и триплетных состояний, возникающих на ранних стадиях фотопроцессов. Исследования проводятся на реакционных центрах фототрофных бактерий и фотосистемы 2 высших растений. К основным работам в этом направлении за время существования лаборатории можно отнести следующие:

- широкое исследование фотохимических свойств фотосинтетических пигментов в растворе (1971 - 76 гг.);
- обнаружение влияния слабых магнитных полей на флуоресценцию фотосинтетических организмов и их препаратов, объяснение механизма этого явления, его применение к исследованию первичных процессов преобразования энергии (1978 - 1984 гг.);
- создание первого спектрометра ЭПР высокого временного разрешения (1980 г.);

- обнаружение и исследование ЭПР свойств вторичной радикальной пары бактериальных РЦ (1991 - 94 гг.);
- обнаружение и исследование ЭПР свойств первичной радикальной пары бактериальных РЦ (1996 - 98 гг.);
- обнаружение эффекта магнетофотоселекции в спектрах ЭПР высокого временного разрешения радикальных пар и триплетных состояний бактериальных РЦ и их применение к изучению структурной организации кофакторов РЦ (1999 - 2003);
- обнаружение конформационного перехода, сопровождающего финальные стадии переноса электрона в бактериальных РЦ (2007 г.);
- обнаружение процесса синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов *in vivo* и *in vitro* (2011 г.);
- предложен механизм тушения триплетных состояний (бактерио)хлорофиллов в отсутствие Т-Т переноса энергии на каротиноиды за счет образования радикал-триплетных пар (2016 г.).

2. Изучение взаимоотношения микобионта и фикобионта у лишайников, в особенности на уровне азотного метаболизма. Исследуются функциональные свойства зеленой водоросли *Trebouxia* sp. в составе лишайника и в свободном состоянии.

К настоящему времени установлено, что основу симбиоза лишайников составляет интеграция метаболических систем бионтов, объединяющая обмен основными элементами питания, такими как углерод и азот, которая отражает взаимосвязь генетических систем бионтов. Обмен углерода, посредством которого осуществляется снабжение микобионта продуктами фотосинтеза водорослей, интенсивно изучается. Считается, что до 90% ассимилированного неорганического углерода утилизируется в клетках микобионта.

Интеграция азотного метаболизма менее изучена, особенно у лишайников, содержащих в качестве фотобионта зеленые водоросли. Кроме того, основные работы в этом направлении выполнены на целых талломах.

Ранее нами с использованием собственной методики разделения и очистки бионтов было установлено, что фотобионт *Trebouxia* sp. из лишайника *Parmelia*

sulcata не способен к поглощению нитратного азота, в отличие от свободноживущих зеленых водорослей. Препараты микобионта и фрагменты таллома, содержащие оба бионта, поглощали нитрат. С помощью масс-спектрометрии было показано, что в интактном талломе лишайника нитрат поглощается микобионтом и лишь затем начинает поступать в фотобионт.

Эти факты указывали на существование определенных дефектов в системе ассимиляции нитрата у фотобионта и давали основания предположить, что нитрат, поглощенный микобионтом, затем в виде каких-то азот-содержащих продуктов метаболизма гриба поступает в фотобионт. С помощью обратного транспорта азот-содержащих соединений осуществляется контроль гриба-хозяина над ассоциированными зелеными водорослями и поддерживается их симбиоз.

В настоящее время изучается возможность обратного транспорта азотсодержащих соединений из микобионта в фотобионт.

3. Исследование физико-химических свойств почвенных гуминовых кислот. Несколько лет назад сотрудником лаборатории О.А. Трубецким была продемонстрирована возможность фракционирования гуминовых кислот различного происхождения на повторяющиеся стабильные фракции. Проводится исследование состава и свойств фракций. В последние 5 лет проводились интенсивные исследования фотохимических свойств фракций, в особенности их способность активировать фоторазложение загрязняющих веществ (в частности, пестицидов).

Наиболее важные научные достижения:

1. Разработана методика измерения спектров ЭПР высокого временного разрешения (ВР–ЭПР) в условиях возникновения магнетофотоселекции (МФС) при возбуждении линейно-поляризованным светом. Указанная методика позволяет изучать МФС короткоживущих фотоиндуцированных состояний с быстрой спин-решёточной релаксацией, таких как триплетные состояния и радикальные пары. Математическое моделирование таких спектров позволяет получать информацию о структурной организации кофакторов реакционных центров (РЦ), в том числе об ориентации их физических (оптических и магнитных) осей. Эта методика применена к исследованиям вторичной радикальной пары [P+QA-] и триплетных состояний как в бактериальных, так и в РЦ Фотосистемы 2 (ФС2). Показано, что спектры ЭПР с МФС радикальных

пар несут информацию о расстоянии между партнерами и об их взаимной ориентации. Эта информация может быть применена для изучения структурных перестроек РЦ в процессе переноса электрона. При гелиевых температурах таких перестроек не происходит, и структура радикальной пары хорошо соответствует обнаруживаемой в монокристаллах в темноте. С повышением температуры ситуация изменяется, и, соответственно, изменяется форма регистрируемого спектра.

Этим же методом (ВР-ЭПР с МФС) впервые получена информация об абсолютной ориентации оптических и магнитных осей промежуточного акцептора и молекулы каротиноида в РЦ фотосинтетической бактерии *Rhodobacter sphaeroides*. Оптическая ось молекулы БФео (дипольный момент Q_y перехода) выходит из плоскости ее тетрапиррольного кольца, что приписано существенному взаимодействию с соседним бактериохлорофиллом РЦ. Оптическая ось каротиноида реакционного центра проходит по "тетиве", т.е. прямой, соединяющей концы изогнутой *cis*-молекулы каротиноида, что представляется вполне естественным. Эти данные важны для дальнейшего исследования механизмов переноса энергии и электрона в реакционных центрах фотосинтеза.

2. Впервые зарегистрированы спектры ЭПР короткоживущих триплетных состояний РЦ фотосистемы 2 при однократно восстановленном первичном акцепторе электрона QA. Предыдущие попытки такой регистрации, предпринятые в различных лабораториях мира, не приводили к положительным результатам. Анализ формы спектра позволил предложить новый механизм переноса электрона в РЦ ФС2, отличающийся от известного для бактериальных РЦ. Этот механизм предполагает образование достаточно долгоживущей радикальной пары (РП), состоящей из хлорофилла "первичного донора" и мономерного хлорофилла. Время жизни РП, образующейся при дальнейшем переносе электрона на феофитин, зависит от зарядового состояния первичного акцептора, что обеспечивает значительное падение квантового выхода потенциально опасного триплетного состояния хлорофилла при уменьшении оттока электронов от РЦ в электрон-транспортную цепь.

3. Методом ВР-ЭПР обнаружен процесс синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов в светособирающих пигмент-белковых комплексах ряда пурпурных бактерий и в пленках изолированных каротиноидов. Биологический смысл этого процесса остается непонятным, однако он

представляет большой интерес для разработки принципов работы искусственных фотопреобразователей солнечной энергии.

4. Показано, что флуоресцентными свойствами в значительной мере обладают низкомолекулярные фракции гуминовых веществ (ГВ). В высокомолекулярных фракциях флуоресцентные свойства выражены слабо. Это различие более характерно для почвенных ГВ. Исследованиями подтверждено, что эффект практически полного отсутствия в высокомолекулярных фракциях также и фотохимической активности, справедлив для всех исследованных ГВ, независимо от биоклиматических условий, географического местоположения, а также метода выделения почвенных и водных гуминовых препаратов. Можно впервые считать доказанным, что хромофоры, определяющие фотоактивные свойства гуминовых кислот, находятся в низкомолекулярных фракциях, вне зависимости от генезиса гуминовых кислот. Полученный результат является приоритетным в международных исследованиях и служит важным шагом в понимании природы фотоактивности гуминовых веществ.

Некоторые публикации:

1. ^{15}N – nitrate uptake and nitrogen exchange in the bionts of the lichen *Parmelia sulcata*. Elena A. Pavlova, A.N. Kuzmin, N.V. Pozdnyakov, A.I. Maslov. *Symbiosis*, 2017, v.72, 117–121
2. Синглет-триплетное деление возбуждения в светособирающих комплексах пурпурных фотосинтезирующих бактерий и в изолированных каротиноидах, Кленина И.Б., Махнева З.К., Москаленко А.А., Кузьмин А.Н., Проскуряков И.И., *Биофизика*, 2013, том 58, №1, с. 54
3. Room temperature coherent spin alignment of silicon vacancies in 4H- and 6H-SiC, Victor A. Soltamov, Alexandra A. Soltamova, Ivan I. Proskuryakov, Pavel G. Baranov, *Physical Review Letters*, 2012, v. 108, iss. 22, 226402(4)
4. EPR characterisation of the triplet state in photosystem II reaction centers with singly reduced primary acceptor Q_A , Feikema W.O., Gast P., Klenina I.B., Proskuryakov I.I., *BBA Bioenergetics*, 2005, v. 1709, 105 – 112
5. Orientation of the Q_y optical transition moment of bacteriopheophytin in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, I.B. Klenina, I.V. Borovykh, A.Ya.

- Shkuropatov, P. Gast and I.I. Proskuryakov, *Chemical Physics*, v.294, N3, 2003, 451 – 458
6. Magnetophotoselection study of the carotenoid triplet state in *Rb. sphaeroides* reaction centers, I.V. Borovykh, I.B. Klenina, I.I. Proskuryakov, P. Gast, and A.J. Hoff, *J. Phys. Chem. B*, v.106, N16, 2002, 4305 – 4312
 7. Recombination dynamics and EPR spectra of the primary radical pair in bacterial photosynthetic reaction centers with blocked electron transfer to the primary acceptor, U. Till, I.B. Klenina, I.I. Proskuryakov, A.J. Hoff, P.J. Hore, *J. Phys. Chem. B*, v.101, N 50, 1997, 10939 – 10948
 8. Electron paramagnetic resonance of the primary radical pair $[D^+\Phi_A^-]$ in reaction centers of photosynthetic bacteria, I.I. Proskuryakov, I.B. Klenina, P.J. Hore, M.K. Bosch, P. Gast, A.J. Hoff, *Chem. Phys. Lett.*, v.257, 1996, 333 – 339
 9. Time-resolved EPR study of the primary donor triplet in D1-D2-cytb559 complexes of photosystem II: temperature dependence of spin-lattice relaxation, M.K. Bosch, I.I. Proskuryakov, P. Gast, A.J. Hoff, *J. Phys. Chem.*, v.100, N6, 1996, 2384 – 2390
 10. Free-radical and correlated radical-pair spin-polarized signals in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers, I.I. Proskuryakov, I.B. Klenina, A. Ya. Shkuropatov, V.A. Shkuropatova, V.A. Shuvalov, *BBA Bioenergetics*, v.1142, N1/2, 1993, 207 – 210
 11. Trubetskaya O.E., Richard C., Trubetskoj O. A., High amounts of free aromatic amino acids in the protein-like fluorescence of water-dissolved organic matter, *Environmental Chemistry Letters*, v.14, 2016, 295 - 500
 12. O. E. Trubetskaya, C. Richard O. A. Trubetskoj, Evaluation of Suwannee River NOM electrophoretic fractions by RP-HPLC with online absorbance and fluorescence detection, *Environmental Science & Pollution Research*, v.22, 2015, 9989
 13. O. Trubetskoj, C. Richard, G. Guyot, G. Voyard, O. Trubetskaya, Analysis of electrophoretic soil humic acids fractions by reversed-phase high performance liquid chromatography with on-line absorbance and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, v.1243, 2012, 62 – 68

14. Trubetskaya O., Shaloiko L., Demin D., Marchenkov V., Coelho C., Proskuryakov I., Trubetskoj O., Combining electrophoresis with detection under UV light and multiple ultrafiltration for isolation of humic fluorescence fractions, *Analytica Chimica Acta*, v. 690, 2011, 263 – 268
15. Oleg Trubetskoj, Claire Richard, Marco Grigatti, Claudio Ciavatta and Olga Trubetskaya. 2008. Evaluation of photochemical properties of compost humic-like material. *Bioresource Technology*, v. 99, 5090-5093
16. Richard C., Trubetskaya O.E., Trubetskoj O.A., Reznikova O.I., Afanas'eva G.V., Aguer J. P., Guyot G., The key-role of the low molecular size fraction of soil humic acids for fluorescence and photoinductive activity, *Environmental Science & Technology*, v.38, 2004, 2052 – 2057
17. Cavani L., Ciavatta C., Trubetskaya O.E., Afanas'eva G.V., Reznikova O.I., Trubetskoj O.A., Capillary zone electrophoresis of soil humic acid fractions obtained by coupling SEC-PAGE, *Journal of Chromatography A*, v. 938, 2003, 263 – 270