МОСКВОСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Протопопов Федор Федорович

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИСТЕМЫ 2 И 1 ВОДОРОСЛЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТОКСИКАНТОВ

03.02.10 – гидробиология, 03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н., проф.
Маторин Дмитрий Николаевич

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10

1.1. Структурные и функциональные особенности организации фотосинтетического аппарата (ФСА) растений и водорослей 10

1.2. Механизм генерации быстрой флуоресценции хлорофилла *a* в фотосинтетических мембранах 15

1.3. Научно-методологические основы регистрации индукционных и световых кривых флуоресценции хлорофилла 16

1.4. Природа замедленной флуоресценции хлорофилла *a* фотосинтетических мембранах 23

1.5. Влияние соединений ртути на растительные организмы 25

1.6. Влияние соединений фенола на растительные организмы 30

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 33

2.1. Материалы исследования 33

2.2. Методы исследования 36

2.2.1. Регистрация флуоресценции хлорофилла на флуориметре AquaPen 36

2.2.2. Регистрация световых кривых, фотохимического и нефотохимического тушения на флуориметре Water-PAM 36

2.2.3. Регистрация индукционных кривых быстрой, замедленной флуоресценции и редокс состояния P700 РЦ ФС1 на флуориметре M-PEA-2 37

2.2.4. Спектральный анализ 38

2.2.5 УФ-индуцированный мутагенез и отбор мутантных клонов 38

2.2.6 Программное обеспечение 39

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ 41

3.1. Влияние ионов метилртути на световые реакции фотосинтеза зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas moewusii* 41

3.2. Индукционные кривые быстрой, замедленной флуоресценции и окислительно-восстановительных превращений P700 водоросли *Scenedesmus quadricauda* при воздействии фенола 60

3.3. Характеристики фотосинтетического аппарата пигментного мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124y-1 69

3.4. Сезонная динамика параметров флуоресценции хлорофилла фитопланктона Москвы-реки. Оценка устойчивости природного фитопланктона к ионам ртути 83

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 99

ВЫВОДЫ 101

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫЙ ОБОЗНАЧЕНИЙ 102

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 103

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 121

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

В современных условиях проблема загрязнения водной среды остро стоит перед человечеством. Зачастую требуется постоянный мониторинг качества воды стратегически важных водных объектов на наличие токсичных веществ (Смуров, 2003; Терехова и др., 2014; Филенко, Михеева, 2007). Ртуть и её соединения достаточно широко применяются в промышленности (химической, нефтеперерабатывающей, электротехнической, тяжелой, в металлургии, приборостроении и радиотехнике) и ранее применялись в сельском хозяйстве и медицине (Pacyna et al., 2010). Токсические свойства ртути в природе хорошо изучены, попадая в природные воды металлическая ртуть метилируется в органическую метилртуть. Ионы метилртути являются крайне устойчивыми в окружающей среде и, попадая в организм человека, они проявляют свойства нейротоксичности (Harada, 1995). Фенол в свою очередь применяется в производстве пластмассы, используется для производства капролактама, бисфенола, а также в качестве дезинфицирующего средства в медицине. Соединения фенолов присутствуют в отходах целлюлозно-бумажных комбинатов и являются опасными для водной экосистемы (Стом, Бейм, 1976; Федтке, 1985; Huang et al., 2003).

Первичное звено трофической цепи водных экосистем – фитопланктон, который является одним из уязвимых компонентов к воздействию токсичных веществ, попадающих в водоемы (Маторин, Рубин, 2012). Главным процессом, обеспечивающим функционирование водных экосистем, является фотосинтез. Он представляет собой сложный физико-химический процесс, затрагивающий метаболизм всей клетки. Светозависимая стадия фотосинтеза протекает при последовательной работе фотосистем 2 и 1 (ФС2 и ФС1), где в результате разделения заряда в реакционном центре (РЦ) происходит фотолиз воды и выделение кислорода. С участием ферментов цикла Кальвина осуществляется фиксация диоксида углерода и синтез продуктов фотосинтеза. При попадание в

водную среду таких токсикантов как тяжелые металлы и фенолы происходит быстрое токсическое воздействие на реакции фотосинтеза у водорослей.

Перспективным методом исследования состояния фотосинтетического аппарата фототрофов является метод регистрации флуоресценции хлорофилла. Этот метод позволяет следить за основными стадиями протекания фотосинтетических реакций. Токсичные вещества могут влиять на различные этапы протекания процесса фотосинтеза, что крайне сложно выявить стандартными методами. В настоящее время с помощью современных флуориметров стало возможным одновременно регистрировать активность ФС2 и ФС1 и оценивать энергизацию тилакоидных мембран (Маторин, Рубин, 2012; Goltsev et al., 2003; Strasser et al., 2010). Однако исследования влияния токсикантов (ионов ртути и фенола) на отдельные стадии световых реакций фотосинтеза у водорослей до настоящего времени не проводилось.

Целью работы является выявление с использованием современных методов флуоресценции изменений в световых реакциях фотосинтеза у водорослей в культурах и природного фитопланктона реки Москвы под воздействием ионов ртути и фенола.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Выявить нарушения в функционировании фотосинтетического аппарата у зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas moewusii* в присутствии ионов метилртути и фенола в разных концентрациях с использованием параметров флуоресценции.

2. Оценить параметры флуоресценции у пигментных мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

3. Оценить функциональное состояние фотосинтетического аппарата у природного фитопланктона на разных участках Москвы-реки, а также определить сезонные изменения-устойчивости фитопланктона к ионам ртути.

Положения, выносимые на защиту:

1. Начальное нарушение фотосинтетических процессов при воздействии ионов метилртути затрагивают акцепторную сторону ФС2 и энергизацию фотосинтетических мембран;
2. Начальное нарушение фотосинтетических процессов при воздействии фенола проявляется в нарушении энергизации фотосинтетических мембран;
3. Мутант *Chlamydomonas reinhardtii CC-124y-1* по флуоресцентным параметрам отличается от дикого типа, в том числе и по пигментному составу;
4. Сезонная динамика параметров флуоресценции отличались на разных участках реки Москвы. Эффективность световых реакций фотосинтеза была выше у весеннего фитопланктона по сравнению с летним. Устойчивость фитопланктона к воздействию ионов ртути летом была ниже, чем весной.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение изменений характеристик световых реакций фотосинтеза с помощью одновременной регистрации быстрой и замедленной флуоресценции (БФ и ЗФ) и редокс состояния P700 ФС1 при воздействии ионов метилртути и фенола на культуру водорослей *Scenedesmus quadricauda.* Установлено воздействие метилртути на параметры световых зависимостей флуоресценции хлорофилла водоросли *Chlamydomonas moewusii*. Определены первичные сайты воздействия ионов метилртути и фенола в зависимости от концентрации токсиканта и времени воздействия. При инкубации с концентрациями ионами метилртути 1 мкМ установлено уменьшение максимального квантового выхода флуоресценции первичной фотохимии ФС2, увеличение доли Q_B-невосстанавливающих центров, которая приводила к снижению квантового выхода электронного транспорта ФС2, индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}), а также замедление скорости восстановления реакционных центров (РЦ) ФС1, связанной со снижением донирования электронами от ФС2. Воздействие высоких концентраций ионов

метилртути вызывало появление дополнительных сайтов ингибирования — это снижение активности донорной стороны ФС2, акцепторной стороны ФС1 и химического потенциала (ΔpH) на мембране тилакоида. Также наблюдалось значительное увеличение диссипации энергии в тепло антенными комплексами (DI_O/RC).

При инкубации водорослей с низкой концентрацией фенола установлено, что токсический эффект приводил к подавлению преимущественно градиента электрохимического потенциала на фотосинтетических мембранах, особенно электрической компоненты (Δψ), пик которой наблюдается во временном диапазоне 10-50 мс. При высоких концентрациях фенола обнаружено влияние на акцепторную сторону ФС2, что приводило к снижению максимального квантового выхода флуоресценции первичной фотохимии ФС2 и увеличению доли Q_B-невосстанавливающих центров.

Впервые были изучены характеристики параметров флуоресценции природного фитопланктона на разных участках Москвы-реки. Показано, что рост обилия фитопланктона, оцененное параметром F_O, в водах реки происходит позднее, чем рост фотосинтетической активности фитопланктона (F_V/F_M). Получены характеристические показатели флуоресценции хлорофилла фитопланктона в зависимости от сезона. Показано, что в весеннее время фитопланктон отличался высокой эффективностью световых реакций фотосинтеза в ФС2, тогда как в середине лета производительность фотосинтетических реакций в ФС2 несколько снижалось. Это характеризовалось изменением параметров флуоресценции хлорофилла как максимальный квантовый выход (F_V/F_M), квантовый выход электронного транспорта ФС2 (φ_{Eo}) и индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}), максимальной скорости нециклического электронного транспорта (ETR), ростом эффективности нефотохимического тушения (NPQ), а также показателями нерегулируемого нефотохимического тушения в антенном комплексе (φ_{Do}). Проведена оценка сезонного изменения устойчивости фитопланктона Москвы-реки к воздействию ионов ртути.

Теоретическое и практическое значение работы. В работе были определены особенности действия соединений ртути и фенола на реакции фотосинтеза фототрофных организмов. Установлены первичные сайты воздействия метилртути и фенола на водорослевые клетки, определены наиболее чувствительные параметры флуоресценции (φ_{Eo}, PI_{ABS}, I_1/D_2), которые могут быть использованы в биомониторинге.

Методические подходы и выводы данной работы были использованы в учебном процессе кафедры биофизики биологического факультета МГУ при проведении летней практики для студентов на Звенигородской биологической станции МГУ и в проведении большого практикума кафедры биофизики.

Результаты данной работы могут быть внедрены в учебные курсы по дисциплинам – «Экология» и «Охрана окружающей среды и рациональное использование ресурсов».

Искусственные мутантные штаммы *Chlamydomonas reinhardtii* были внедрены как тест-системы по оценке качества воды на токсическую и мутагенную активность в лаборатории микробиологии КазНУ имени аль-Фараби.

Результаты данной работы могут быть рекомендованы для–мониторинга водной среды, при проведении биотестирования, а также и в биотехнологических исследованиях.

Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментальных исследований, представленные результаты получены исключительно самим автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Результаты работы были представлены в материалах конференций: 9th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium (2015, China); V съезд биофизиков России, раздел экологическая биофизика (Ростов на Дону, 2015). Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морские биологические исследования достижения и перспективы» (Севастополь, 2016); Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2016: XI International Science-Technical Conference, (Sevastopol, 2016);

Международном симпозиуме и школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, 2016); конференции Математика Компьютер Образование (Москва 2016); II Международной научно-практической конференции «Рациональное природопользование традиции и инновации» (Москва, 2017); III Международной научно-практической конференции "Роль технических наук в развитии общества (Кемерово, 2018). Результаты и выводы работы докладывались и обсуждались на научных семинарах кафедры биофизики и гидробиологии биологического факультета МГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 статей в журналах, из них 5 в рекомендованных изданиях ВАК (4 работы включены в международную базу данных Scopus и 3 – в Web of Science), а также 5 статей опубликованы в материалах конференций.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и обсуждения, заключения, выводов, списка условных сокращений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 157 источников, из которых 110 на английском языке. Работа изложена на 124 страницах машинного текста, в том числе 4 страницы в приложении, содержит 29 рисунков (в числе 1 в приложении) и 6 таблиц (в том числе 1 в приложении).

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю Д.Н. Маторину за чуткое руководство. Автор признателен и благодарен всем сотрудникам кафедры гидробиологии и биофизики МГУ за помощь в работе и ценные советы, а также за всестороннюю поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурные и функциональные особенности организации фотосинтетического аппарата (ФСА) растений и водорослей

Фотосинтез обычно разделяют на световую (фотохимические реакции) и темновые реакции (цикл Кальвина где происходит фиксация CO_2). В фотохимических реакциях, протекающих в ФС2 световая энергия позволяет оторвать электрон от воды с последующим образованием молекул кислорода. Электроны в дальнейшем попадают в пул пластохинонов и переносятся далее на цитохром b_6f комплекс и потом далее на пластоцианин, который далее отдает электрон в ФС1, и в конечном итоге производит НАДФН. Между тем реакции переноса электрона по фотосинтетической мембране создает протонный градиент на мембране тилакоида, и в результате активации АТФ-синтазы образуется молекулы АТФ. В конечном итоге, АТФ и НАДФН используются в цикле Кальвина для фиксации CO_2 (Gao и др., 2014). Линейный перенос электронов от воды до $НАДФ^+$ и другие конкурирующие процессы представлены на рисунке 1.

Фотосинтез является уникальным физико-химическим процессом, который связан с действующим светом, а также переносом электрона против градиента термодинамического потенциала (Рубин, 2013). Перенос электронов по ЭТЦ осуществляется от воды (окислительно восстановительный потенциал которого равен $E_{1/2}$ =+0,82 В, при pH 7) к НАДФ ($E_{1/2}\approx$ - 0,32 В) при этом затрачивается энергия двух квантов света с участием обоих фотосистем, работающих последовательно (ФС2 и ФС1). Z-схема сопряженной взаимодействия двух фотосистем приставлена на рисунке 2 (Merchant, Sawaya, 2005).

В результате возбуждения электрона с внешней орбитали атома Mg пигмента P680* электрон с определенной долей вероятности может быть захвачен молекулой Фео в результате которого происходит разделение зарядов и

образуется радикальная пара P680*Фео → $P680^{+}Фео^{-}$ (Regner, Hanssum, 1992). Далее электрон

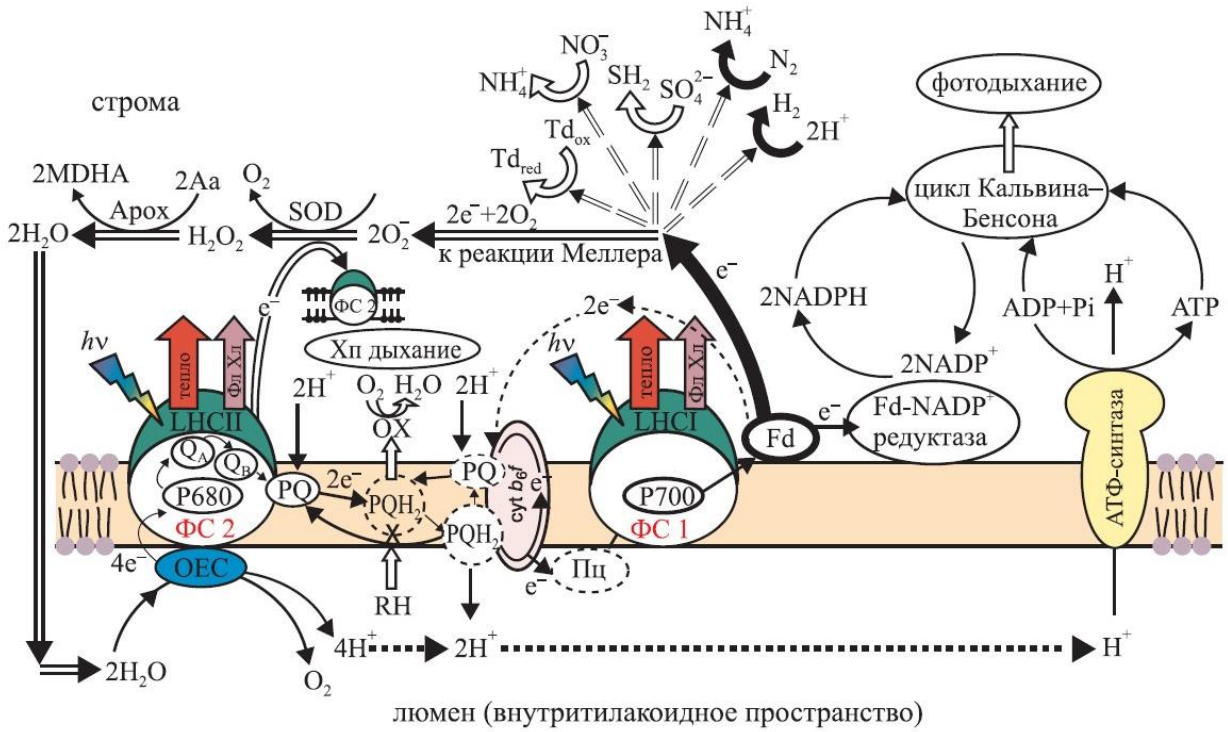

Рис. 1. Схема путей превращения энергии, поглощаемой световой энергии в хлоропластах (Гольцев и др., 2014).

от восстановленной молекулы феофитина переносится на молекулу хинона Q_A ($P680^{+}Фео^{-}$ Q_A → $P680^{+}$ $ФеоQ_A^{-}$), в результате образуется более стабильное состояние [$P680^{+}Фео^{-}$] Q_A^{-}, чем $P680^{+}Фео^{-}$. После этого Q_A^{-} отдает электрон вторичному хиноному акцептору Q_B за время 100 мкс ($Q_A^{-}Q_B$ → $Q_AQ_B^{-}$). Электронная дырка, образовавшаяся на пигменте $P680^{+}$ закрывается электроном от первичного донора – остатка тирозина Tyr_z 161. Молекула пластохинона Q_B диссоциированная с белковым комплексом ФС2 способна принять два электрона и дополнительно две иона водорода со стороны стромы тилакоида. После однократного срабатывания РЦ Q_B^{-} акцептирует второй электрон от Q_A^{-}, образуя молекулу Q_B^{2-} ($Q_A^{-}Q_B^{-}$ → $Q_AQ_B^{2-}$). Отрицательно заряженная молекула пластохинона Q_B^{2-} обладает высоким сродством к ионам водорода и в результате реакции Q_B^{2-} + H_2→Q_BH_2 образуется молекула электрически нейтральной формы QH_2 пластохинол (Тихонов, 1996).

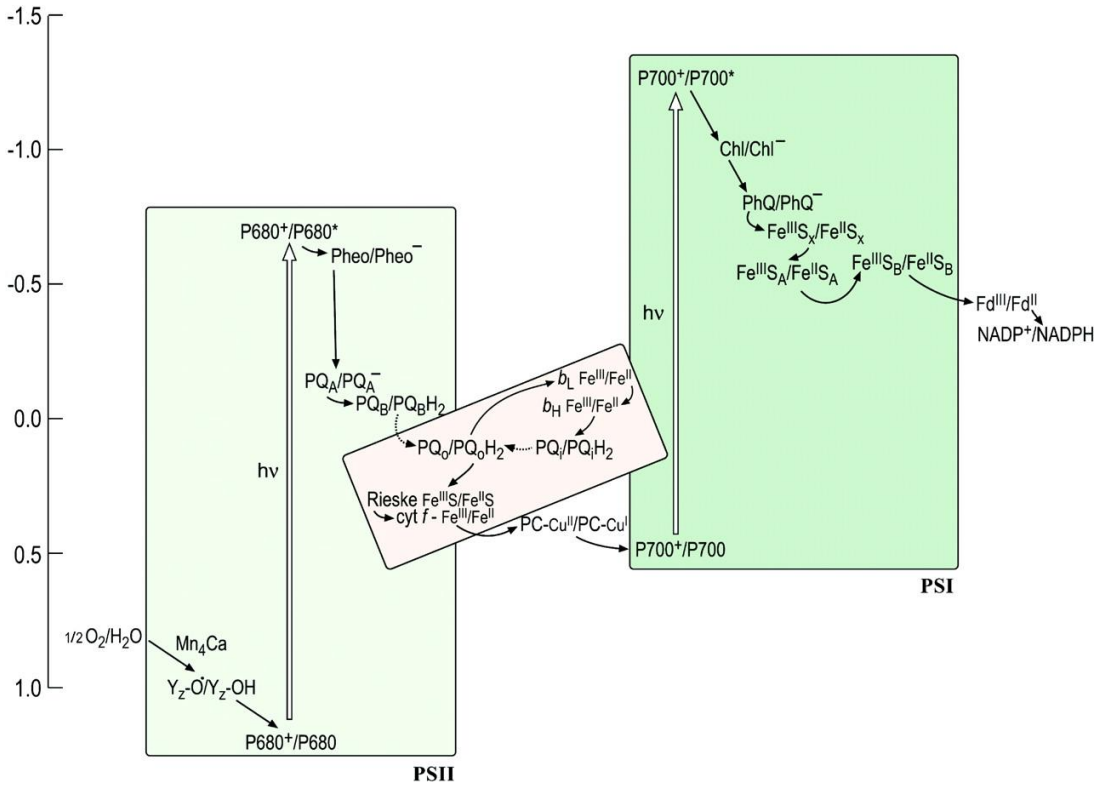

Рис. 2. Z-схема, описывающая перенос фотосинтетического электрона. Каждый носитель показан как в его окисленной, так и в восстановленной форме, в которой каждый носитель принимает электрон от донора, чтобы стать восстановленным и повторно окисляется после того как передаст электрон акцептору (Merchant, Sawaya, 2005).

Молекула пластохинола отсоединяется от сайта связывания на D1 белке и переноситься в межмембранное пространство с двумя протонами из стромы и 2 электронами (Рисунок 3), покидает свое место связывания на D1 белке, а на её связывается другая молекула хинона из пула пластохинонов.

Пигмент реакционного центра ФС2 $P680^+$ является в природе сильнейшим окислителем и обладает высоким редокс потенциалом (около 1,2 В), которая позволяет принять электрон с молекулы воды в результате фотолиза на КВК. Донором электрона для пигмента $P680^+$ является редокс-активный остаток тирозина TyrZ ($TyrZP680^+ \rightarrow TyrZ^+P680$), который входит в состав КВК. КВК содержит активном центре ионы марганца, формирующих марганцевый кластер, который является основным донором электронов для восстановленного пигмента $P680^+$. Поглощение четырех квантов света марганцевый кластер отдает четыре

электрона, далее происходит окисление двух молекул H_2O и в результате которого марганец восстанавливается до исходной степени окисления ($2Mn^{4+}$ + $_2H_2O \rightarrow 2Mn^{2+} + 4H^+ + O_2$). Каталитический цикл состоит из 5 состояний S-состояний: S_0–S_4 (Рубин, 2013). Поглощение кванта света при состоянии S_0, марганцевого кластера, приводит к отделению одного электрона, также катион магния окисляется (+1) и кластер переходит в состояние S1. На последующих состояниях марганцевого кластера происходит дальнейшее изменение степени окисления марганца и изменение состояния кластера (S_2, S_3, S_4). Когда марганцевый кластер переходит в состояние S_4, молекула воды окисляется до

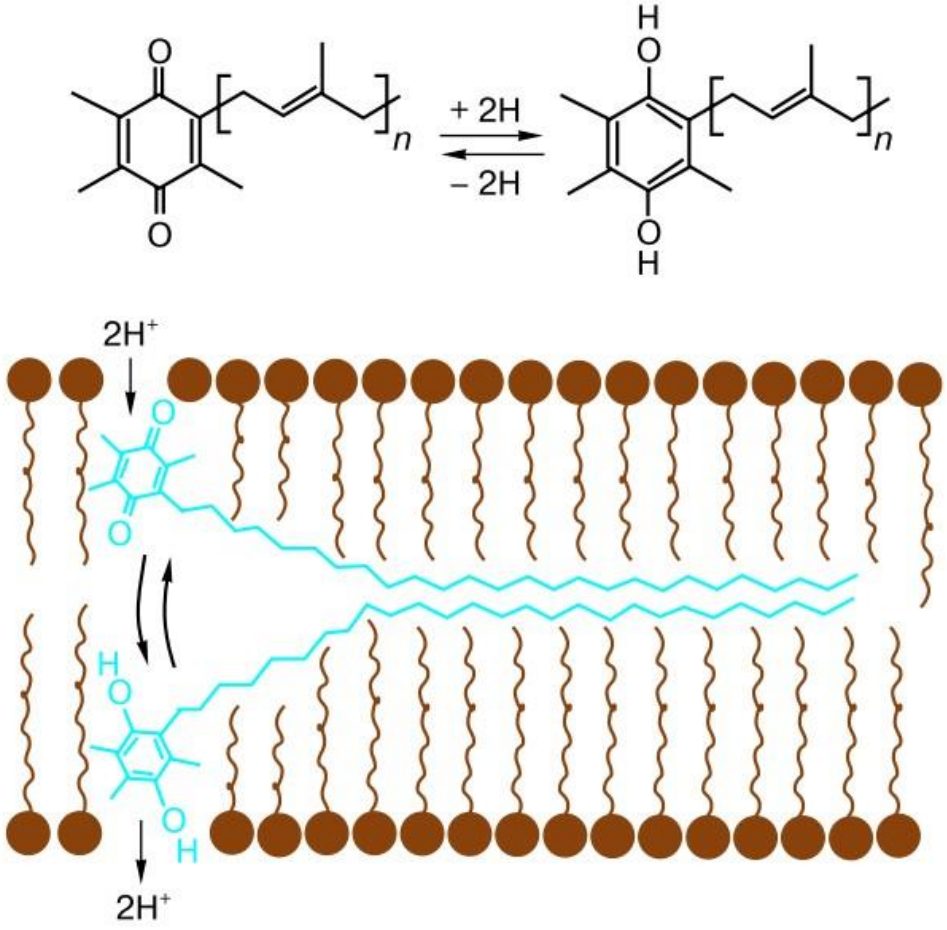

Рис. 3. Окислительно-восстановительные превращения пластохинона и её расположение в мембране тилакоида (Тихонов, 1996).

протонов и молекул кислорода. Электроны, полученные в результате окисления воды, приводят обратно марганцевый кластер в состояние S_O (Гольцев и др., 2014). Выделение протонов происходит последовательно в процессе S-цикла: S_0–

S_1 (один протон), S_2–S_3 (один протон) и S_4–S_0 (два протона) (Рубин, 2013). Ионы водорода (H^+) в результате фотолиза воды остаются в люмене, тем самым способствуя увеличению протонного градиента на мембране тилакоида. Вторичный метаболит кислород диффундирует из хлоропласта наружу.

Молекула пластохинона на сайте связывания акцептора Q_B получив 2 электрона и присоединив 2 иона водорода отсоединяется с сайта связывания и диффундирует во внутрь липидного бислоя. Молекула пластохинола передает два электрона цитохрому b_6/f-комплексу, а также отдает два иона водорода во внутритилакоидное пространство. Далее молекула пластохинона вновь может быть присоединена к сайту связывания ФС2. Образование разницы потенциалов ΔpH на мембране тилакоида приводит к активации АТФ-синтазы и образованию молекул АТФ. Первый электрон переданный на гем цитохрома b_6 используется в Q-цикле на восстановление молекулы пластохинона. Второй электрон восстанавливает центр Риске и далее электрон переноситься на цитохром f, а с него на мобильный акцептор пластоцианин. Акцептор пластоцианин передает электрон на донорную сторону ФС1, данный акцептор является водорастворимым и содержит в активном центре ионы меди, которые и принимают электрон от цитохрома f. Электрон попав на донорную сторону ФС1 восстанавливает окисленный РЦ $P700^+$ (Тихонов, 1996).

Воздействие света вызывает разделение зарядов на РЦ ФС1 Р700 с образованием радикальной пары $P700^+A_0^-$ за время 10 пс, далее после 20-50 пс электрон передается на акцептор A_1 (Рубин, 2013). Акцептор A_1 в свою очередь передает электрон на железосерные центры F_X и F_A/F_B и ферредоксин. Ферредоксин (Фд) получив электрон диффундирует вдоль мембраны на сайт связывания находящийся на ферменте ферредоксин-НАДФ-редуктазе (ФНР) и там происходит образование $НАДФ^+$ → НАДФН. Образование НАДФН необходимо два электрона, а Фд способен переносить только 1 электрон. Существует дополнительные акцепторы электронов флавопротеины и флавин которые являются промежуточными звеньями способствующие восстановлению $НАДФ^+$ до НАДФН (Рубин, Кренделева, 2003).

1.2. Механизм генерации быстрой флуоресценции хлорофилла *a* в фотосинтетических мембранах

Поглощение квантов света молекулами пигментов— первый акт запасания энергии при фотосинтезе. Главным пигментом зеленых растений и водорослей является хлорофилл (Маторин, Рубин, 2012). Существую два наиболее вероятных состояния для молекулы хлорофилла *a*: S_0 (основное не возбужденное) и состояние S* (возбужденное). В результате возбуждения молекулы происходит переход одного из двух π-электронов с низкой энергетической орбиты на более высокую. Для молекулы хлорофилла существует два вероятных колебательных подуровня возбужденного электронного состояния: более высокий S^*_2 (при поглощении кванта синего излучения) и более низкий S^*_1 (при поглощении кванта красного излучения), что определяет в спектре поглощения хлорофилла два главных пика (Маторин, Рубин, 2012).

Источником флуоресценции являются молекулы хлорофилла *a,* связанные с РЦ. Одним из главных источников флуоресценции является молекулы хлорофилла ФС2, тогда как флуоресценция ФС1 составляет не более 5-30%. Другие же молекулы, находящиеся внутри антенных комплексов с очень высокой эффективностью передают энергию возбуждения на молекулы хлорофилла *a,* тем самым они не флуоресцируют, исключение составляют фикобилипротеины (Glazer, 1984). Перенос энергии возбуждения по антенному комплексу к РЦ ФС2 и ФС1 происходит по механизму индуктивного резонанса (Рубин, 2013). Согласно которому, энергия возбуждения от периферических пигментов антенного комплекса с высокой эффективностью передается на РЦ, где и происходит первичная реакция разделения зарядов (Маторин и др. 2013).

Интенсивность флуоресценции во многом зависит от состояния первичного хинонного акцептора Q_A, а также от интенсивности нефотохимического тушения (Гольцев и др., 2014; Корнеев Д. Ю., 2002). Известно, что при оптимальных условиях после темновой адаптации, когда все акцепторы Q_A окислены, наблюдается минимальная интенсивность флуоресценции (F_O) и потери вовремя

переноса энергии возбуждения в антенном комплексе в виде флуоресценции минимальны (около 0,3%). Тогда как восстановление акцепторов Q_A приводит постепенному закрытию РЦ и к росту интенсивности флуоресценции, после полного закрытия всех РЦ, наблюдаем максимальную интенсивность флуоресценции (F_M) (Гольцев и др., 2014; Маторин, Рубин, 2012).

Спектры флуоресценции у водорослей и высших растений представлены наложением нескольких пиков от ФС2 и ФС1 на разных длинах волн (Гольцев и др., 2014). Максимальная интенсивность флуоресценции на листьях при комнатной температуре наблюдается при 685 нм (Холл, Рао, 1983), тогда как пик поглощения хлорофилла *a in vivo* наблюдается при ~675 нм. Разница в длине волны поглощения и длине волны испускания получило название сдвиг Стокса (Маторин, Алексеев, 2013).

1.3. Научно-методологические основы регистрации индукционных и световых кривых флуоресценции хлорофилла

Регистрация флуоресценции хлорофилла a на флуориметрах типа PAM

Принцип работы однолучевых флуориметров типа PAM (Pulse-Amplitude-Modulation) построен на модулировании возбуждающего света. Как правило в этой системе в качестве источника возбуждения флуоресценции выступает светодиод, с помощью которого генерируются разной длительности импульсы света и темновых интервалов, чтобы добиться нужной плотности потоков квантов света в секунду. Так как фотосинтез является квантовым процессом ему не так важна постоянность – сколько средняя количество квантов света падающих на антенный комплекс за определенный короткий промежуток времени.

Термин PAM был придуман для новой методики модуляции света, специально разработанный для флуориметров. Технические особенности которого подробно описаны в патентной публикации (Schreiber, 2004). Основными особенностями этого метода являются:

Измерительный свет (ML) состоит из очень коротких вспышек (мкс диапазоне), которые могут применяться повторно на разных частотах. При низкочастотных микросекундных вспышках света они не вызывают существенного роста выхода флуоресценции;

Насыщающий свет (SP) обычно генерируют довольно яркие (до 16000 мкмоль $м^{-2}с^{-1}$) обычно до 1 с импульсы света, что достаточно для закрытия всех РЦ и высвечивания максимального уровня флуоресценции F_M (после темновой адаптации) или F_M' (на свету).

Существует ещё один тип освещения — это действующий свет (AL), как правило его подбирают конкретно под протокол измерения. Например, для быстрых световых кривых могут подбираться интенсивности света от 25 до 3000 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$.

На рисунке 4 представлен основной принцип регистрации флуоресценции с помощью PAM-флуориметров. Перед измерением образец обычно темноадаптируют в течении 5-30 минут далее протокол измерения начинается с измерения F_O, как правило после темновой адаптации считается что все Q_A находятся в оксиленном состоянии, импульсом измерительного света (ML) фотодиод через светофильтры регистрирует начальный уровень флуоресценции хлорофилла. Как было сказано ранее чрезвычайно важно правильно определить уровень F_O. Затем включается насыщающий импульс (SP), который закрывает все РЦ и восстанавливается все акцепторы Q_A, в данный момент мы наблюдаем точку насыщения или максимальный уровень флуоресценции F_M. В результате, имея двf этих значения можно подсчитать максимальную величину переменной флуоресценции $F_V=F_M - F_O$, который является показателем световой энергии,которая может максимально быть поглощена и использована в фотохимических реакциях. При нормировании данного параметра на F_M получается параметр F_V/F_M, который часто применяется в различных исследованиях (Kumar et al., 2014).

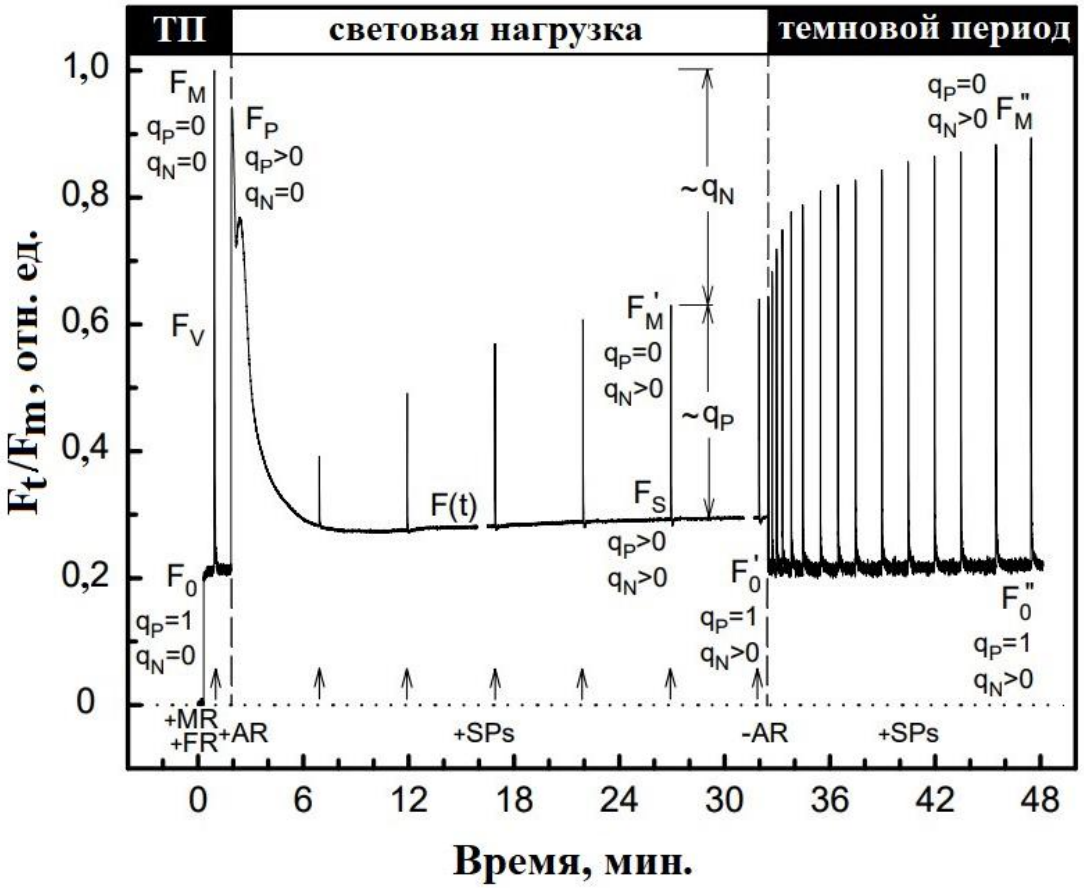

Рис. 4. Медленная кинетика индукции флуоресценции хлорофилла записанная *in vivo* флуориметром PAM-2000 (Walz, Германия) на 10-ти недельном кукурузном листе (*Zea mays*). F_O – минимальный уровень флуоресценции после темновой адаптации, F_M – максимальный уровень флуоресценции после темновой адаптации, F_V – переменная флуоресценции, F_t – интенсивность флуоресценции при световой нагрузке, F_M’ – максимальный уровень флуоресценции на свету (Roháček, Bartak, 2008)

После выключения насыщающего света (SP) образец некоторое время адаптируются темноте, потом включается действующий свет (AL). Уровень флуоресценции растет под воздействием AL далее при достижении определенного времени происходит уравновешение процессов фотохимического и нефотохимического тушения и регистрируется интенсивность F_t, которая занимает промежуточное положение между F_M и F_O. Разница между флуоресценцией на свету F_t и максимальной флуоресценцией F_M объясняется действием непрерывного света, которое показывает образование

фотохимического и нефотохимического тушения. Для расчета квантового выхода на свету была введена формула:

$$Yield = (F_M' - F_t) / F_M' \quad (1)$$

Этот параметр показывает квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС2 при световой нагрузке (Маторин, Алексеев, 2013).

Существуют две модели устройства ФСА: модель лужи (puddle) и модель озера (Lake) (Kramer et al., 2004).

$$\boldsymbol{q_p = \frac{(F'_M - F_t)}{(F'_M - F'_O)}} \quad (2)$$

q_P – фотохимическое тушение флуоресценции на свету, это энергия которая поглощается РЦ в общем количестве поглощаемой энергии ФС2

$$\boldsymbol{q_L = q_P \times \frac{F'_O}{F_t}} \quad (3)$$

q_L – фотохимическое тушение флуоресценции на свету при условии, что множество РЦ равномерно распределены по общей антенне (Kramer et al., 2004).

$$\boldsymbol{q_N = \frac{(F_M - F'_M)}{(F_M - F_O)}} \quad (4)$$

Данный параметр отражает образование нефотохимического тушения на свету. Еще одна наиболее часто применяемая формула расчета нефотохимического тушения Штерна-Фольмера:

$$\boldsymbol{NPQ = \frac{F_M}{F'_M} - 1} \quad (5)$$

Подробнее о нефотохимическом тушении и о механизмах их образования рассматривается в литературе (Malnoë, 2018; Niyogi et al., 2005; Pinnola, Bassi, 2018).

JIP-тест.

Индукционная кривая флуоресценции содержит много полезной информации о фотосинтетическом аппарате. Ранее были предприняты попытки

имитировать OJIP кривые флуоресценции (Lazár, Schansker, 2009). В 1991 году Штрассер и Говинджи опубликовали статью о записи кинетики OJIP переходов в временном промежутке от 40 мкс до 1 с используя флуориметр типа PEA (см Strasser et al. 1995). Спустя четыре года Штрассер и Штрассер (1995) предложили метод анализа OJIP–кривых (рис. 5), основой которого являлась точка перегиба J (2-3 мс при насыщающей вспышке) и назвали его JIP- тестом. Более ранних работах точка перегиба J и I назывались I_1 I_2, соответственно (Lazár, 2006).

Теоретическая основа JIP-теста была описана подробно Штрассером и соавторами в 2004 году, в последующем она дополнялась дополнительными параметрами (Гольцев и др., 2014; Strasser et al., 2010) . В основе анализа в JIP-теста лежит энергия фотонов, поглощенных антенными комплексами ФС2, включающий в себя захват фотона (trapping), прямой перенос электрона далее акцептора Q_A и диссипация энергии в виде тепла. В JIP-тесте за условную границу принимается фаза J между одиночным и множественными оборотами электрона через РЦ.

В JIP-тесте предполагается, что относительная интенсивность в фазе J (V_J) дает информацию о транспорте электронов за пределы Q_A (Strasser et al., 2004; Strasser et al., 1995). Однако, во многом суть этого процесса предполагает, что параметр зависит от редокс состояния пула пластохинонов в темноте (Tóth et al., 2007), а также при определенных стрессовых условиях возможно влияние степени укладки тилакоидных мембран. В этом случае перенос электронов за пределы Q_A означает замедление повторного окисления Q_A поскольку пул пластохинонов становиться меньше и меньше молекул пластохинона связаны с Q_B - связывающим сайтом. Изменения, связанные с вероятностью переноса электрона далее Q_A (ψ_o) однозначно связаны стрессовым воздействием.

В JIP-тесте было предложено брать параметры F_O и F_M условно в качестве меры поглощенного потока фотонов за единицу времени на поперечное сечение, CS_O и CS_M соответственно. Можно отметить, что характеристика изменений этих параметров показала, что они почти нечувствительны к изменениям содержания в листьях хлорофилла пока размеры антенн РЦ остаются неизменными (Dinç.,

2012). Однако следует отметить, это вероятно это не распространяется на разбавленные водорослевые и тилакоидные суспензии.

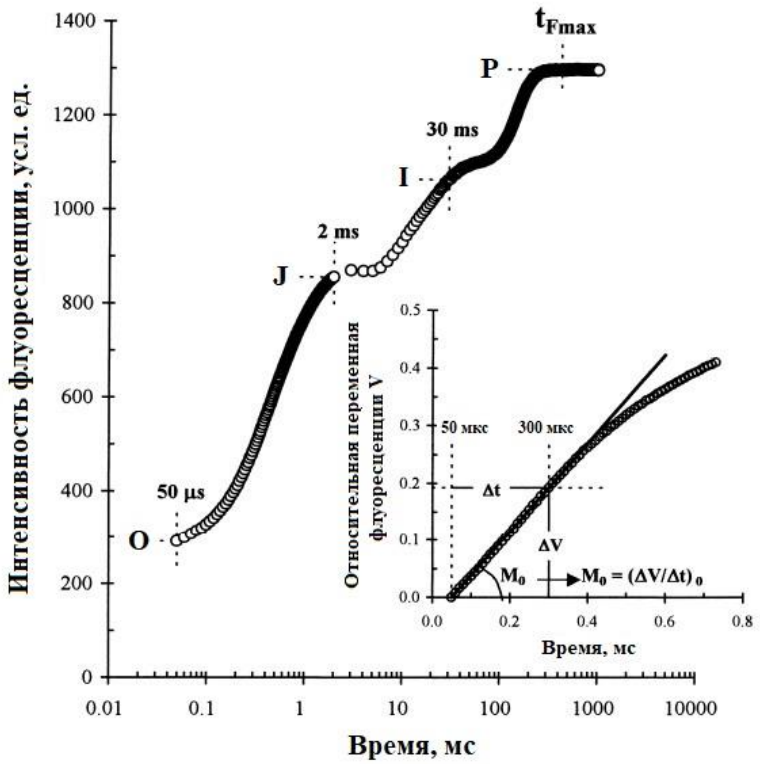

Рис. 5. На данном рисунке представлена наиболее обычные времена появления точек перегиба на OJIP-кривой. Кривая представлена в логарифмическом временном масштабе, который наиболее часто используется для отображения точек OJIP. В углу представлена кривая относительной переменной флуоресценции в линейном временном промежутке от 50 мкс до 0,8 мс, показано, как рассчитывается начальный угол наклона кривой флуоресценции на линейном участке роста (с изменениями по Tsimilli-Michael et al., 2000)

Ранее было показано, что площадь над кривой и уровнем F_M при воздействии диурона пропорциональна пулу восстановленных молекул Q_A. Этот принцип анализа применили и для ситуации, когда нет воздействия диурона, где предполагается, что площадь между флуоресцентными переходами и F_J равно одному обороту во всех РЦ, то есть через РЦ переноситься один электрон, к которому площадь выше переходных процессов OJIP-кривой может быть нормализована (Strasser et al., 2004). Предполагается, что наклон кривой флуоресценции хлорофилла между F_O (20 мкс или 50 мкс в зависимости от

прибора) и $F_{150мкс}$ чувствителен так называемому явлению «сопряженности», то есть передаче энергии между антенными комплексами нескольких РЦ ФС2 (α- или β-центрами). Тогда как наклон между F_O и $F_{300мкс}$ нечувствителен к сопряженности (Stirbet, 2013; Strasser, Stirbet, 2001).

Параметр индекс производительности (PI_{ABS}) ФС2 был создан для того чтобы охватить три различных основных параметров ИФХ фотосинтетической активности ФС2. PI_{ABS} является чувствительным к следующим изменениям: изменению относительного эффективного размера антенны, изменению максимального квантового выхода ФС2 и изменению относительного положения фазы J (F_J). Рассчитывается индекс производительности ФС2 следующим образом:

$$\boldsymbol{PI_{ABS} = \frac{\frac{F_V}{F_M} \times V_J}{\frac{4 \times (F_{270мкс} - F_O)}{F_M - F_O}} \times \frac{\frac{F_V}{F_M}}{1 - \frac{F_V}{F_M}} \times \frac{1 - V_J}{V_J}} \qquad \textbf{(6)}$$

$$\text{где } \boldsymbol{V_J = \frac{(F_J - F_O)}{(F_M - F_O)}} \qquad \textbf{(7)}$$

Исследования также показали, что IP-фаза роста флуоресценции связана с переносом электронов на акцепторы ФС1 (Schansker, Strasser, 2005) и что относительная амплитуда фазы IP связано содержанием ФС1 на листьях (Ceppi et al., 2012; Oukarroum et al., 2009). JIP-тест остается хорошим инструментов для быстрого мониторинга большого количества образцов (Kalaji и др., 2016), однако, как только станут определены параметры которые коррелируют с определенными стрессовыми факторами, не следует полагать, что интерпретация этих параметров, приведенная в JIP- тесте верна (Stirbet, Govindjee, 2011). Кроме того, следует иметь ввиду, что JIP-тест сильно зависит от правильности определения основных параметров как F_O и F_M, от них будет зависит правильность нормализации данных (Tóth et al., 2012).

1.4. Природа замедленной флуоресценции хлорофилла *a* фотосинтетических мембранах

Замедленная флуоресценция (ЗФ) – это свет испускаемый зелеными растениями, водорослями и фотосинтезирующими бактериями в инфра красном диапазоне спектра на короткое время после того, как подвергалась воздействию света. Источником ЗФ является хлорофилл *a* (Goltsev et al., 2009b). Впервые это явление наблюдали Стреллер и Арнольд в 1951 году. (Strehler, Arnold, 1951)

Кванты ЗФ испускаются в основном вторично возбужденными состояниями молекул хлорофилла *a* ФС2 (Amesz, 2012). Хоть и механизмы быстрой и замедленной флуоресценции разные, но спектры испускания ЗФ сходы со спектрами излучения флуоресценции хлорофилла *a* (Grabolle, Dau, 2005; Sonneveld et al., 1980). В обоих случаях (БФ и ЗФ) излучение кванта происходит в результате излучательной дезактивации первого синглетного возбужденного состояния молекул хлорофилла *a*, принадлежащим ФСII (Krause, Weis, 1991; Lang, Lichtenthaler, 1991).

Испускание квантов ЗФ происходит в результате рекомбинации зарядов в РЦ ФС2:

$$P680^{+}Q_A^{-} \rightarrow P680^{*}Q_A \rightarrow P680Q_A + h\nu \qquad (8)$$

На каждом этапе фотохимической реакции существует вероятность обратного тока электронов. Электроны от Q_A^- могут обратно вернуться на $P680^+$ преодолев достаточно высокий барьер энергии активации ($\Delta E \sim 70$ кДж/моль). Если P680 останется в своем основном состоянии и энергия электрона рассеется в тепло, то произойдет безизлучательная рекомбинация зарядов. С низкой долей вероятности рекомбинация зарядов может привести к формированию возбужденного состояния P680*, которое может передать энергию к антенным комплексам и привести к испусканию кванта света (De Grooth, Van Gorkom,

1981), такая реакция называется излучательной рекомбинацией, она является источником формирования ЗФ.

$$L=N\cdot k\cdot\varphi\cdot[Z^{+}P680^{+}Q_A^{-}] \quad (9)$$

Где, N – количеству РЦ. k – константа скорости рекомбинации, $[Z^{+}P680^{+}Q_A^{-}]$ вероятность состояния центра с разделенными зарядами, φ – квантовый выход излучательной дезактивации синглетного возбужденного состояния хлорофилла *a*.

Из уравнения видно, что интенсивность ЗФ пропорциональна количеству излучательных состояний, концентрация которых напрямую зависит от скорости последующий стадий переноса электронов (Маторин, Алексеев, 2013). Кривая затухания ЗФ может быть разложена на несколько компонент с временами затухания от миллисекунд до нескольких минут (Malkin, 1977). Интенсивность ЗФ в процессе затухания уменьшается на несколько порядков, хотя количество квантов света, излучаемых за временя жизни каждой из компонент, сравнимо по величине, что предполагает сравнимое количество предшественников, ответственных за генерацию той или иной реакции (Маторин, Алексеев, 2013). Можно выделить три группы процессов, определяющих кинетику затухания ЗФ (Haveman, lavorel, 1975; Goltsev et al., 2009b; Kalaji et al., 2012):

1. Реакции типа «утечка»: спад связан с сокращением числа предшественников ЗФ, в результате прямых окислительно-восстановительных реакций с один из зарядов пары.

2. Реакции типа «дезактивации»: предшественники ЗФ исчезают в результате редокс-реакций в рамках пары разделенных зарядом. состоянии $Z^{+}P680Q_A^{-}$– обратный перенос электрона от Q_A^{-} на Z^{+}). Обратные реакции переноса электронов в состояниях РЦ-предшественниках (например, $P680^{+}Q_A$, $Z^{+}P680Q_A^{-}$ или $S_2ZP680Q_AQ_B^{=}$) определяют более медленные компоненты ЗФ – миллисекунды или секунды.

В обоих описанных случаях кинетика затухания ЗФ определяется кинетикой исчезновения предшественников ЗФ, то есть исчезновением пары разделенных зарядов (Гольцев и др., 2014). Генерация ЗФ зависит не только от состояния акцепторной части ФС2, но и от окисленных переносчиков на донорной стороне ФС2. Для многих компонент ЗФ показана связь с накоплением положительных зарядов в КВК (Malkin, 1977). Темновая дезактивация более окисленных состояний в менее окисленные происходит по одноступенчатому механизму ($S_3 \rightarrow S_2 \rightarrow S_1$), при том что при длительном освящении постоянным светом устанавливается равномерное распределение по состояниям (~25% в каждом из состояний) (Маторин, Алексеев, 2013). Темновая дезактивация S_2 и S_3 состояний и переход их на S_1 состояние может занять нескольких секунд до нескольких минут.

В модельных опытах показано, что создание искусственного трансмембранного электрохимического потенциала на мембране при добавлении одновалентных солей металлов и наложении внешнего электрического поля стимулирует ЗФ. Между энергизацией мембраны и ЗФ существует экспоненциальная зависимость:

$$\boldsymbol{L \approx e^{-\frac{\Delta E - F\Delta\psi + 2.3RT\Delta pH}{kT}}} \qquad (10)$$

1.5. Влияние соединений ртути на растительные организмы

Ртуть считается наиболее токсичным элементом среди тяжелых металлов с «неизвестной физиологической функцией» в водорослях (Backor et al., 1998; Poirier et al., 2008; Kumar et al., 2014). Ртуть ингибирует фотосинтез и оказывает сильное воздействие на различные жизненные функции водорослей, действуя на рост, проницательность клеток, содержание хлорофилла и фиксацию азота (Campanella и др., 2000) (Campanella et al., 2000).

Соединения ртути способны накапливаться в водорослях и в последующих трофических уровнях концентрация ртути только возрастает (Lanza et al., 2017;

Wu, Wang, 2011). Накапливаясь в высокой концентрации в рыбе и в морепродуктах, неорганические и органические формы ртути проявляют токсикологические характеристики, включающее нейротоксичность, нефротоксичность и токсичность в отношении желудочно-кишечного тракта (Harada, 1995; Stohs, Bagchi, 1995). В литературе имеются данные о том, что ионы тяжёлых металлов действуют путем связывания с органическими кислотами или фосфатными анионами, блокируя важнейшие группы (такие как сульфгидрильные), а также путем замещения ионов других металлов в белках (Demidchik et al.,1997; Ochiai, 2012; Rauser, 1999; Stohs, Bagchi, 1995). Вследствие этого развиваются процессы перекисного окисления липидов, наблюдается нарушение ионного транспорта и гомеостаза, повышение концентрации АТФ, ингибирование ферментных систем (ферментов антиокислительной системы, АТФаз) и повреждение ДНК (Demidchik и др., 1997; Kováčik и др., 2015; Luo и др., 1996; Päivöke, 2003) (Demidchik et al., 1997; Kováčik et al., 2015; Luo et al., 1996; Päivöke, 2003).

Среди тяжелых металлов ртуть проявляет высокую токсичность для процессов протекающих во время фотосинтеза ингибируя как световые, так и темновые реакции (Filippis, Ziegler, 1993; Lu et al., 2000). Действие металла оказывает неблагоприятное воздействие на жизненно важные функции водорослей, рост, клеточную проницаемость, содержание хлорофилла и азотфиксацию (Campanella et al., 2001). Известно, что соединение метилртути по своему действию на фотосинтетический аппарат более пагубно воздействует чем просто ионы Hg^{2+} (Antal et al., 2009; Graevskaya et al., 2003; Kukarskikh et al., 2003). Было показано что метилртуть при низкой концентрации воздействует на электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2 и увеличивает нефотохимическое тушение в антенном комплексе (Graevskaya et al., 2003), а также на реокисление пула пластохинонов (Antal et al., 2009) и перенос электронов между фотосистемами (Kukarskikh et al., 2003). Увеличение токсического эффекта метилртути наблюдалось при сильном освящении и неблагоприятно низкой температуре (Matorin et al., 2009). Ранее отмечалось, что

ионы ртути могут повреждать Fe-S центры ФС1 (Kojima et al., 1987) и ингибировать активность фермента ферродоксин-НАДФ-оксидоредуктазы (Honeycutt, Krogmann, 1972).

Результаты провиденных исследований свидетельствуют о высокой чувствительности ФС2 водоросли *C. moewusii* к действию сульфата меди и метилртути, причем действие последней характеризуется большей токсичностью при низких концентрациях (Антал и др., 2009). Показано, что метилртуть воздействует на электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2 и увеличивать фракции мембран с «медленным» пулом ПХ (увеличение фазы IP) (Антал и др., 2009). Объясняется уменьшением амплитуды более чем в два раза быстрых компонент, снижением жизни быстрой и средней компоненты темновой релаксации переменной флуоресценции в миллисекундном диапазоне. Кроме того, действие метилртути вызывало нарушение реокисления пула ПХ и увеличивало трансмембранный pH градиент (увеличение параметра qE на 72 часа), что, вероятно, отражает нарушение процесса фосфорилирования в тилакоидах (Антал и др., 2009).

Ионы метилртути при концентрации выше 0,2 мг/л уменьшали максимальный квантовый выход (F_V/F_M) у зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, степень ингибирования зависела от времени воздействия от условий освещения (50 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$) при низкой освещённости воздействие было несколько ниже (Kukarskikh et al., 2003). К тому же, влияние ионов метилртути на клетки водоросли наблюдали ингибирование донорной стороне ФС2 и нарушение электронного транспорта между Q_A и Q_B, к тому же ещё приводило к уменьшению нефотохимического тушения флуоресценции (qN) и приводило к увеличению доли закрытых реакционных центров (восстановленных Q_A). В целом известно, что метилртуть влияет на фотосинтетический транспорт электронов *C. reinhardtii*, с различных сторон показывая сильный ингибирующий эффект на фотосинтетические процессы чем ионы Hg^{2+} (Kukarskikh et al., 2003).

Метилртуть при концентрации 0,2 и 0,002 мг/л на диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* показала медленное уменьшение активности ФС2, тогда

как при добавлении ионов ртути водоросль оказалась не чувствительной к тем же концентрациям (Graevskaya et al., 2003).

Позднее токсические эффекты ионов ртути и метилртути на фотосинтез и рост популяции морской диатомых водорослей *Thalassiosira weissflogii* были повторно исследованы, но уже с помощью двух методов: two-photon excitation fluorescence lifetime imaging (запись двухфотонного возбуждения затухания флуоресценции) (FLIM) и проточной цитометрии (FCM). Для фотосинтеза, воздействие ртути увеличило среднюю продолжительность жизни флуоресценции хлорофилла, тогда как при воздействии метилртути такого увеличения не было (Wu et al., 2012). Это может быть вызвано ингибирующим действием ртути на цепи переноса электронов. Данные роста культур показали, что уменьшение роста культуры под влиянием ртути, главным образом связано с увеличением числа поврежденных клеток, в то время как скорость деления живых клеток неизменно. Токсический эффект метилртути на рост культуры был представлен снижением скорости деления клеток всех клеток (Wu et al., 2012). Кроме того, внешний вид клеток и данные FCM отражают морфологические изменения диатомовых под влиянием ртути и метилртути ярко и количественно. Исследования отражают различие в токсическом воздействии метилртути и ионов ртути в клетках водорослей.

Thalassiosira weissflogii подвергали воздействию различных концентраций ионов ртути (0,5 и 5мкг/л) и метилртути (0,02 и 0,4 мкг/л) в течении 18 дней. В результате выявили, что при воздействии метилртути может вырабатываться резистентность к последнем, происходит синтез небелковых теольных соединений (GSH, PC_2), которая приводит к снижению скорости поглощения метилртути с питательной среды (Wu, Wang, 2013).

Известно, что ртуть является сильным ингибитором фотосинтетического электронного транспорта и это достигается ингибированием различных сайтов (сторон) таких как донорная сторона ФС2 или КВК (кислород-выделяющий комплекс), пластоцианин, фермента НАДФ-ферродоксин оксиредуктазы или в ФС1 и ФС2 (Singh et al., 1993). Токсикологический эффект ртути в некоторых

случаях (для например *Dunaliella tertiolecta*) показано что связано с ингибированием КВК и является причиной снижения квантового выхода ФС2 (Samson, Popovic, 1990). Более того, Hg^{2+} уменьшает способность фотосистемы направлять энергию возбуждения света по фотохимическому пути и это увеличивает время затухания флуоресценции (Juneau et al., 2001).

В некоторых исследованиях оценивалась чувствительность различных видов водорослей к ртути используя PAM-флуориметрию. Перенос энергии возбуждения в фикобилисомы у клеток *Spirulina platensis* ингибировалась в присутствии очень малой концентрации ртути (2,01 мг/л) (Murthy et al., 1989). Juneau и др. (2001) исследовали *Ankistrodesmus falcatus, Selenastrum capricornutum, Chlorella vulgaris, Microcystis aeruginosa* и *Pediastrum biwae,* и сообщили что параметры флуоресценции (а именно максимальный квантовый выход ФС2 Φ_M, максимальный квантовый выход при уравновешенном состоянии электронного транспорта ФС2 (Φ'_M), фотохимического тушение (qP) и нефотохимическое тушение (q_N), являются индикаторами эффекта ингибирования Hg^{2+}. На установившемся (стационарном) состоянии электронного транспорта, Juneau и др. (2001) наблюдали 50% снижение Φ'_M, когда эти водоросли подвергали воздействию 9.34, 16.83, 61.78, 56.97 и 73.22 мг/л Hg^{2+}, соответственно, в течении 96 часов. В другом исследовании, при инкубации с Hg^{2+} сообщается о 25% снижении Φ_M и 61% уменьшении Φ'_M (5 часов, 500 мкг/л) (Juneau, Papovic, 1999). Wu и др. (2012) показали полезность системы формирования изображения двух-фотонного возбуждения затухания флуоресценции (TRE-FLIM) обнаружении неблагоприятного воздействия Hg^{2+} на *Thalassiosira weissflogii*, где инкубация водорослей с Hg^{2+} приводило к повреждению фотосистемы. Lu и др. (2000) сообщили что, при инкубации с Hg^{2+} в концентрации 20 мкМ увеличилось нефотохимическое тушение (NPQ) на *S. Platensi*, что часто приводило в результате к уменьшению F_V/F_M. Сообщается что хлорид метилртути при концентрации выше 0,2 мг/л приводил к уменьшению отношения F_V/F_M (который характеризует максимальную эффективность утилизации энергии в ФС2) у зеленых водорослей *C. reinhardtii*; где степень

ингибирования зависит от времени инкубации и всегда выше под освящением (50 мкЕ $м^{-1}с^{-2}$) чем при темновой инкубации (Kukarskikh et al., 2003). Кроме того, при воздействии метилртути на клетки водорослей наблюдается повреждения на донорной стороне ФС2 и повреждения электронного транспорта между Q_A и Q_B, в то время как снижается фотохимическое тушение флуоресценции (qN) под влиянием токсиканта увеличивается доля закрытых реакционных центров. В общем известно, что ионы метилртути повреждают фотосинтетическую цепь транспорта электрона *C. reinhardtii* с нескольких местах, показывая сильный ингибирующий эффект на фотосинтетические процессы по сравнению с ионами Hg^{2+} (Graevskaya и др., 2003).

Так же известно, что ионы Hg^{2+} уменьшает значение максимального квантового выхода F_V/F_M (48%) у морской водоросли *Gracilaria edulis* (Abu-Bakar, Ahamad-Zakeri, 2012). Abu-Bakar и Ahamad-Zakeri сообщили что 1 мг/л ионов Hg^{2+} вызывало 82% снижение максимального квантового выхода (F_V/F_M) у *Caulerpa racemosa*, снижение на 47% у *Caulerpa lentillifera* и снижение на 13% у *U. pertusa*. Lu и др. (2000) предполагают, что уменьшение максимальной эффективности первичной фотохимии (F_V/F_M) наблюдаемый при увеличении концентрации ртути, может быть результатом увеличения доли Q_B-невосстановливающих реакционных центров ФС2. Однако, уменьшение F_V/F_M может быть также связано с ингибированием переноса энергии возбуждения от фикобилисом к реакционным центрам ФС2.

1.6. Влияние соединений фенола на растительные организмы

Наиболее часто встречаемыми органическими загрязнениями водоемов являются фенольные соединения, которые обладают токсическим воздействием на весь водоем (Флеров, 1973). Фенольные соединения нередко присутствуют в сточных водах нефтехимических, переработки древесины, лакокрасочных и фармацевтических производств (Харлампович, Чуркин, 1974).

Так в сточных водах лакокрасочной промышленности содержатся: фенол, бутилфенол, дифенилпропан, а-нафтол и нитрофенолы (Сахарнов, 1971). Хлор- и нитрофенолы наиболее часто встречаются в сточных водах производств стицидов, а также пестециды с фенольными ядрами (Мельников и др., 1977).

Основными источником фенолов и других органических загрязнений являются сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов (ЦБК), такие как лигнин (фенол содержащий полимер) и фенольные продукты его распада (Лейте, 1975; Стом и др., 1990). При попадании сточных вод с лигнином происходит её осаждение на дно и ухудшение кислородного режима водоема (Грушко, 1982). Лигнин также способен сорбировать другие органические вещества (Грушко, 1982). В то время как при деструкции лигнина образуются фенолы, спирты, кетоны, меркаптаны, органические и жирные кислоты (Грушко, 1982).

Фенолы обладают способностью к автоокислению с образованием гидрохинонов в присутствии же растительных оксидаз возможен ряд химических превращений, например, бензол фенол пирокатехин ортобензохинон 4-фенилсульфонилпирокатехин, продукты окислительной конденсации; гидрохинон пара-бензохинон продукты окислительной конденсации (Стом, 1982).

Фенольные соединения в основном отличаются количеством и расположением гидроксильных групп. По количеству гидроксильных групп различают моно- ди- и тригидроксипроизводные бензола.

Дигидроксибензолы как пирокатехин, гидрохинон и резорцин отличаются положением гидроксильных групп: орто-, пара- и мета-, соответственно (рис. 6). Не редко эти фенолы яаляются характерными для сточных вод (Грушко и др., 1975), в природе же часто встречаются производные этих соединений фенола (Сиренко, Козицкая, 1988). Пирокатехин, гидрохинон и резорцин отличаются между собой способностью к окислению и являются простейшими полифенолами и изомерами друг друга.

Существуют естественные природные источники фенолов в водной среде за счет ферментативных реакций оксидазного типа у водорослей и других

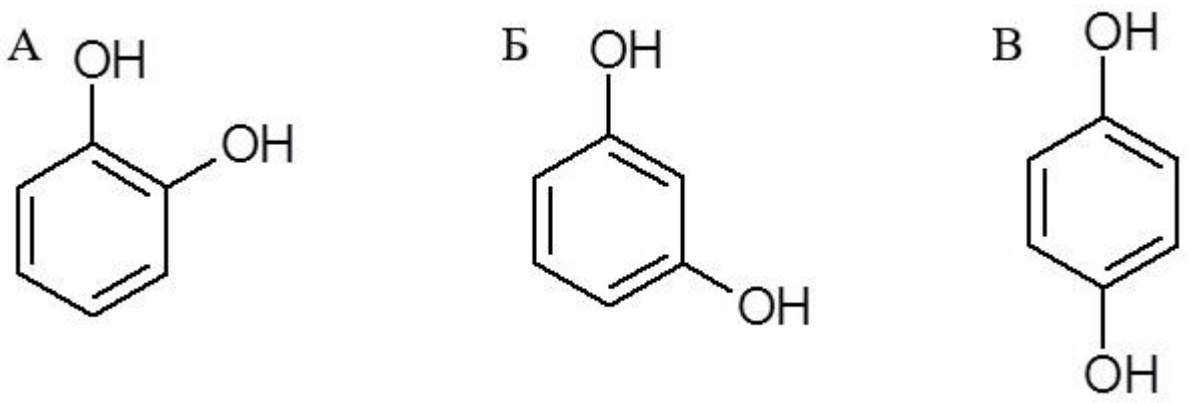

Рис. 6. Представлена структура изомеров дигидроксибензола: пиракатехин – 1; резорцин – 2; гидрохинон – 3. (с изменениями https://lektsia.com/3x634f.html)

гидробионтов (Иванова, Степанова, 1995; Котелевцев, 1997) и естественные механизмы самоочищения вод природе от этих соединений фенолов.

Сброс промышленных стоков пагубно влияет на рост и функционирование фитопланктона водоемов, который является основой функционирования водной экосистемы. На примере водной экосистемы озера Байкал было показано, что фенолы даже при низких концентрациях способны снижать интенсивность фотосинтеза фитопланктона (Кожова и др., 1992). А рядом с зоной разлива сточных вод численность фитопланктона значительно падает (3-4 раза) (Худяков, 2004). Хорошо изучено действие сложных производных фенола–гербицидов на первичные процессы фотосинтеза в основном на изолированных (Holt et al., 1993; Van Rensen, 1989; Sandmann, Boger, 1986; Vermaas, Arntzen, 1983). Рассматривалось влияние фенола на рост численности водорослей, а также влияние на скорость фотосинтеза на длительных экспериментах (Костяев, 1973; Лукина, 1972). При высоких концентрациях фенольных соединений (1-10 мМ) оказывало воздействие на скорость движения цитоплазмы и на сульфгидрильные группы белков у харовых водорослей (Стом, Бейм, 1976). Существуют работы по сравнению токсичности фенольных соединений экзогенной и эндогенной природы (Юрин, 2002). Также немногочисленными являются работы по исследованию пиракатехина, пара-бензохинона в высоких и малых концентрациях (2 и 0.2 мМ соответственно) (Апарцин и др., 1979).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Объектами служили альгологически чистые культуры зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda, Chlamydomonas moewusii, Chlamydomonas reinhardtii* и природный фитопланктон Москвы-реки. *Безжгутиковая водоросль Chlamydomonas moewusii* Gerloff, (Lewin 1002, CALU 228), полученная из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета. Одноклеточные водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard CC-124 дикий тип и пигментный мутант CC-124y-1 были любезно предоставлены сотрудниками кафедры биотехнологии Казахского национального университета имени аль-Фараби (г. Алма-Ата, Казахстан), зеленые водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, а также природный фитопланктон Москвы-реки.

Культивирование водорослей. Водоросли выращивали при 25^0C фототрофно на минеральной среде Успенского №1 (Успенская, 1966) в колбах Эрленмейера при pH 7.0 и интенсивности освещения люминесцентными лампами 50-80 мкмоль $м^{-2}с^{-1}$ при постоянном перемешивании (120 об/мин) и продолжительностью светового и темнового периодов 12 и 12 ч.

Исследования природного фитопланктона проводили на пробах воды, отобранных в Москве-реке. Пробы отбирались погружным батометром на глубине 0,5 м, рядом с береговой линией. Участки отбора проб располагались на 3-х точках: вход реки Москву – станции (ст.) Тушино; условная середина – ст. Воробьевы горы и на выход реки их Москвы – ст. Дзержинский. Активность (флуоресцентные показатели) и обилье (содержание хлорофилла *а оцененное с помощью* F_O) природного фитопланктона исследовали с 2009-2010 года. Чувствительность природного фитопланктона к ионом ртути и изменение флуоресцентных характеристик (JIP-тест, световые кривые) исследовали 2016-2017 года.

Пробы отбирали на расстоянии 3 – 5 м от берега, с глубины не менее 0,5 м в период с октября 2009 по декабрь 2010 г. ежемесячно, за исключением февраля 2010 г. В период ледостава пробы отбирали из лунки, которую формировали во льду с помощью пешни или бура. Пробы для определения концентраций хлорофилла *a* и флуоресценции фитопланктона отбирали в нестерильные непрозрачные пластиковые бутылки объемом 1 л и доставляли в переносной сумке-холодильнике не позднее одного часа после их отбора.

Определение концентрации хлорофилла a в воде проводили флуориметрическим методом с помощью сертифицированного флуориметра МЕГА-25, созданном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ. Пробы воды в течение 1-2 часов после отбора фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/F (Whatman). Фильтры помещали в 90% ацетон, хлорофилл *a* экстрагировали при температуре +4°C и держали темноте в течение 18–24 ч с последующей регистрацией спектров поглощения. Методику и расчета содержания пигментов по спектру поглощения проводили по ГОСТ 17.1.4.02-90. Строили кривые соотношения содержания хлорофилла *a* (рассчитанные спектрофотометрическим методом) и сигнала флуоресценции (F_O).

Обработка токсикантами. В качестве токсических агентов в работе использовались следующие вещества: хлорид ртуть ($HgCl_2$) (Aldrich Chemical Company, Inc. USA); метилртуть (CH_3Hg^+) (MeHg chloride) (Aldrich Chemical Company, Inc. USA) и фенол (C_6H_5OH) (Sigma-Aldrich, США). На лабораторных культурах водорослей использовались концентрации ионов метилртути 0.1, 0.5, 1, 10, 100 мкМ, а также фенола в концентрациях 0.01, 0.1, 10 мМ. Для оценки устойчивости фитопланктона Москвы-реки к хлориду ртути использовали концентрации 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 и 100 мкМ.

Культуры водорослей и фитопланктон реки Москвы инкубировали в присутствии токсикантов в тех же условиях, что и при культивировании водорослей (см. выше). Водоросли, достигшие стационарной фазы роста, разливали в условиях стерильности по 10 мл в пробирки объемом 15 мл и вводили токсикант. Водоросли инкубировали от нескольких часов до трех суток при

разных концентрациях токсикантов в тех же условиях, что и при выращивании культуры. Концентрация клеток перед добавлением токсикантов составляла ~300 тыс. кл.мл$^{-1}$.

Определение численности водорослей. Подсчет клеток проводился в камере Горяева (V=0,0001 мл) под световым микроскопом при трехкратном ее заполнении. Для флуоресцентных измерений использовали культуру водоросли на экспоненциальной фазе роста (2 сут.). Исследуемые вещества добавляли к суспензии клеток, инкубировали в течении 3, 6, 24, 48, 72 часа и проводили регистрацию флуоресценции хлорофилла и счет клеток.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Регистрация флуоресценции хлорофилла на флуориметре AquaPen

OJIP–кривые флуоресценции хлорофилла у природного фитопланктона измеряли с помощью флуориметра AquaPen-C AP 100 (PSI, Чехия) при интенсивности насыщающей вспышки 3000 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (100%) длина волны возбуждения 630 нм. Протокол измерения в приборе «OJIP», длительность измерения составляла 2 с. Регистрацию индукционных кривых флуоресценции хлорофилла проводили после 15 минутной темновой адаптации проб воды, перед измерением образцы аккуратно встряхивались. Измерение проводились затененной комнате. Кюветы объемом 4 мл, заполнялись до 2 мл далее кювета вставлялась в измерительную камеру и производилась регистрация индукционных кривых быстрой флуоресценции (БФ). Индукционные кривые БФ анализировали с помощью JIP-теста (Strasser et al., 2004). Формулы расчета параметров JIP-теста и описание представлены в приложении 1.

2.2.2. Регистрация световых кривых, фотохимического и нефотохимического тушения на флуориметре Water-PAM

С помощью импульсного флуориметра Water-PAM (Walz, Германия) проводили измерения световых кривых. Интенсивность зондирующего импульса ровнялась 0,1 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$, интенсивность действующего света до 1600 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$ и интенсивность насыщающей вспышки 2000 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (0,8 с) длина волны возбуждения 460 нм. Квантовый выход разделения зарядов на свету рассчитывали по формуле $Yield = (F'm - F_t')/F_m'$. Нефотохимическое тушение на свету рассчитывали по формуле $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$. Скорость нециклического электронного транспорта вычисляли по формуле $ETR = Y \times E_i \times 0.5$, где E_i – интенсивность действующего света (мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$) (Schreiber et al., 1995). Из кривой ETR были рассчитаны

следующие параметры: α – угол наклона световой кривой на светолимитированном участке, ETR_{max} – максимальная скорость потока электронов на свету, взята как среднее на светонасыщающем участке кривой, $E_н$ – насыщающая интенсивность света рассчитывается по формуле $E_н = ETR_{max}/\alpha$ (Jassby, Platt, 1976; Platt et al., 1977).

2.2.3. Регистрация индукционных кривых быстрой, замедленной флуоресценции и редокс состояния P700 РЦ ФС1 на флуориметре M-PEA-2

Одновременную регистрацию индукции БФ и замедленной флуоресценции (ЗФ) и редокс изменения состояния P700 (при изменении рассеивания на длине волны 820 нм) проводили на приборе M-PEA-2 (Hansatech instrument ltd., UK).

Модуль оптического блока состоит из трех эмиттеров и четырех детекторов (рис. 7). Флуоресценции хлорофилла индуцировали красным светом при длине волны 625 нм с интенсивностью 1500 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$, отражение при 820 нм измеряли при интенсивности излучателя 500 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ (50%), общее время

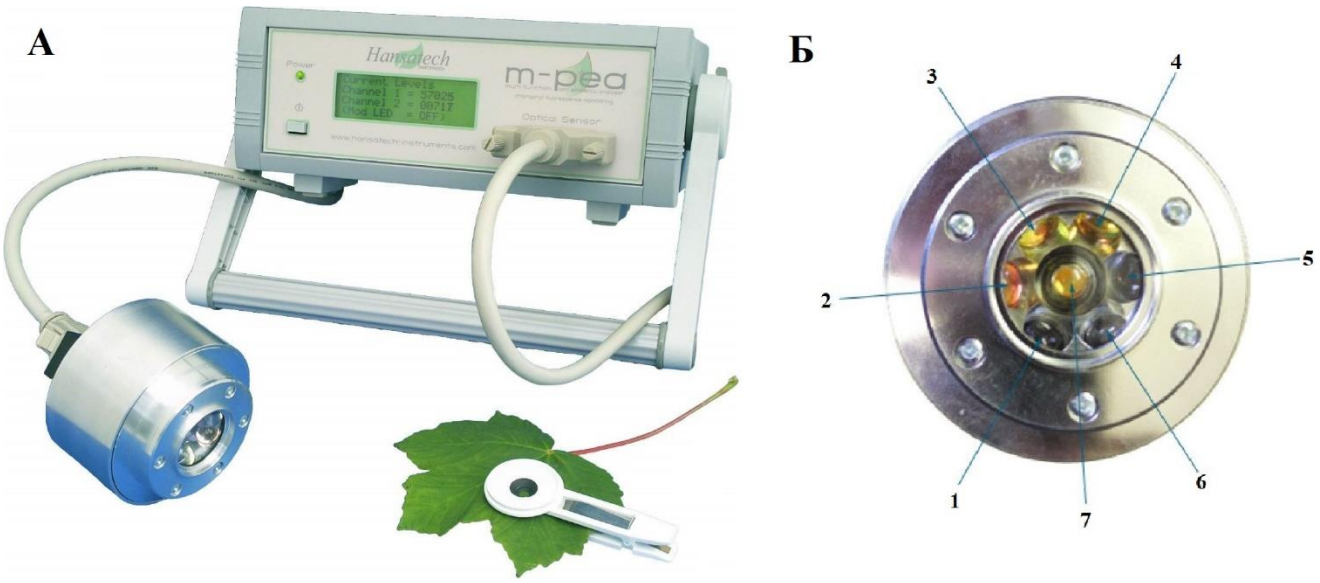

Рис. 7. Внешний вид мультифункционального флуориметра M-PEA-2 (А) Модуль оптического датчика M-PEA (Б): (1) – излучатель при 820 нм $P700^+$, (2) – детектор $P700^+$, (3) – детектор БФ, (4) – детектор ЗФ, (5) – детектор оптической плотности, (6) – излучатель дальнего красного света, (7) – источник действующего света (http://www.hansatech-instruments.com).

протокола измерения составила 60 с. ЗФ регистрировали в режиме чередования актиничного освещения и темноты (multi) (Goltsev et al., 2009b; Strasser et al., 2010).

Все измерения на приборе M-PEA-2 проводились на более концентрированных культурах водорослей 1.5-2 млн кл. мл$^{-1}$. Поскольку для измерения оптических свойств отражения при длине волны 820 нм сигнал должен быть достаточно высоким.

Перед измерением образцы водорослей концентрировали на мембранном фильтре, затем отфильтрованный образец помещали в измерительную клипсу и выдерживали в темноте в течении 5 минут. Измерение на флуориметре M-PEA-2 выполнялись только на клетках, предварительно отфильтрованных на поверхности фильтра. Ранее проведенные контрольные измерения на флуориметре AquaPen-C AP-C 100 (PSI, Чехия) показали, что применение процедуры обогащения проб на фильтре не влияло на физиологического состояние клеток.

2.2.4. Спектральный анализ

Спектры возбуждения флуоресценции образцов водорослей регистрировали спектрофлуориметром Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) с настройкой TCSPC (O'Connor, Philips, 1984). Спектры поглощения водорослей в растворе ацетона 90% и *in vivo* регистрировали на спектрофотометре HITACHI-557 (Япония) и на портативном спектрофотометре на базе Ocean Optics USB 2000 (Ocean Optics, США).

2.2.5 УФ-индуцированный мутагенез и отбор мутантных клонов

Удобными объектами для выявления действия различных загрязнений (в т.ч. и мутагенных) на популяции водорослей является зеленая одноклеточная водоросль хламидомонада (*C. reinhardtii*) – модельный объект в генетике. Она

может быть использована не только для определения токсичности загрязненной воды, но и ее мутагенной активности.

Мутантные штаммы *C. reinhardtii* были получены методами индуцированного мутагенеза. Для получения мутантов применяли ультрафиолетовое излучение длиной волны 254 нм (40 эрг $мм^{-2}$). Облученную суспензию переносили на чашки Петри со средой L2 min. Посевы выставляли на свет (120 мкмоль $м^{-2}с^{-1}$) и через 10-14 дней учитывали результаты. В генетических экспериментах для исследования материала использовали метод макроколоний и метод микроколоний (Zayadan et al., 2014).

Полученный в фотоавтотрофных условиях клон представлен пигментным мутантом светло-зеленого цвета, которые мы обозначили как СС-124у-1. Клетки штаммов СС-124у-1 имели размер от 2 до 3,5 мкм и на твердой среде образовывали колонии светло-зеленого цвета. Штамм имел два жгутика одинаковой длины расположенные на переднем конце клетки. Весь хлорофилл сосредоточен в хроматофоре. Водоросли хорошо росли при температуре 22-30 ^{o}C на жидких и агаризованных питательных средах L-min в фотоавтотрофных условиях.

2.2.6 Программное обеспечение

Анализ и обработку представленных данных проводили с помощью программного обеспечения M-PEA-data-analyzer V.5.2. Microsoft Excel 2016, Statistica v. 10, Origin 9.1.

Записи сигналов по быстрой, замедленной флуоресценции и модулированного отражения обрабатывались в программном обеспечении M-PEA-data-analyzer V. 5.2 (София, Болгария). Расчеты параметров JIP-теста автоматически выполнялись программными обеспечениями m-pea V. 1.10 и FlourPen V. 1.0.6.1 (PSI Ltd., Чехия). Дополнительные вычисления проводились в пакетах Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, США). Для построения

графиков использовали пакеты OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, США).

Статистические расчеты проведены с помощью пакета Statistica v.10 (StatSoft, Inc., США). Проверка статистических гипотез на сравнение двух независимых выборок осуществлялась непараметрическим критерием Манна-Уитни, для множественного сравнения независимых выборок использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Уровень значимости принимали за $p<0,05$. Количество повторностей измерения флуоресцентных характеристик БФ, ЗФ, редокс состояния P700 (также параметры JIP-теста) составляла не менее чем 5 (5-10). Кривых световых зависимостей флуоресценции (ETR, NPQ, Yield) не менее чем 3 (3-5).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние ионов метилртути на световые реакции фотосинтеза зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas moewusii*

При подготовке данного раздела были использованы материалы ранее опубликованных собственных статей в соавторстве (Протопопов и др., 2015).

Соли тяжелых металлов занимают особое положение среди загрязнений внешней среды, что связано с их высокой токсичностью, способностью накапливаться в организмах и передаваться по трофической цепи (Мур, Рамамурти, 1987). Тяжёлые металлы, попадая в водоемы, оказывают токсическое действие на фитопланктон, который является первичным звеном в системе пищевых связей водных организмов и определяет состояние водной экосистемы в целом. Одними из наиболее опасных для окружающей среды являются соединения ртути (Bertrand, Poirier, 2005), такие как органические соединения ртути, в частности метилртуть, которая образуется в результате меркурирования органических соединений и является чрезвычайно токсичным веществом (Juneau et al., 2001; Lu et al., 2000). Среди метаболических процессов внутри растительной клетки чувствительным к действию тяжелых металлов является фотосинтез. Известно, что соединения ртути ингибируют световые реакции фотосинтеза (Juneau et al., 2001; Антал и др., 2009). Основной механизм действия этих соединений ингибирование мембранных процессов в результате взаимодействия с SH-содержащими соединениями и дисульфидными группами белков, а также замещение коферментов (Stohs, Bagchi, 1995). В последнее время в связи с необходимостью организации систем оперативного контроля за качеством природных вод и токсичностью стоков биотестирование приобретает широкое значение (Perminova et al., 2001; Заядан, Маторин, 2015; Филенко, 1988). Важнейшим оперативным биотестом являются водоросли, являющиеся главными продуцентами в водоемах и своеобразными экологическими мишенями для солей

металлов, часто поступающих в водные экосистемы (Vavilin, 1995, Заядан, Маторин, 2015, Филенко, 1988).

В наших исследованиях ионы метилртути снижали скорость роста интенсивной культуры (1,5-2 млн. кл. мл$^{-1}$) водорослей *Scenedesmus quadricauda* уже при концентрации 1 мкМ, тогда как для разбавленной культуры (300 тыс. кл. мл$^{-1}$) водоросли *Chlamydomonas moewusii* снижение скорости роста наблюдалось при концентрации ионов метилртути 0,1 мкМ. Ростовые кривые интенсивной культуры водоросли *S. quadricauda* представлены на рисунке 8. Известно, что

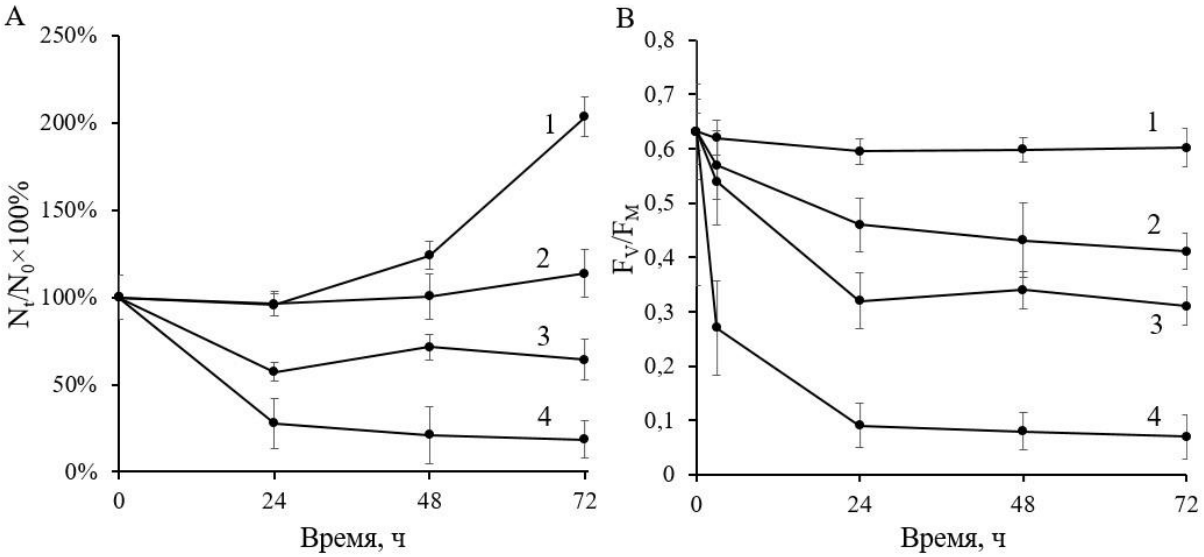

Рис. 8. Ростовые кривые изменения количества клеток (в %) в суспензии (А) и максимальный квантовый выход флуоресценции (Б) у зеленой водоросли *S. quadricauda* инкубированные с метилртутью. Контрольная культура водорослей (1) и инкубированные с метилртутью водоросли при различных концентрациях: 1 мкМ (2) 10 мкМ (3) и 100 мкМ (4). Вертикальными планками представлена стандартная ошибка среднего.

после пересадки культуры клеток на свежую питательную среду, рост культуры сопровождается с определенными стадиями развития: лаг-фаза, фаза ускорения роста, фаза экспоненциального роста, фаза замедления роста, стационарная фаза и фаза отмирания. Как видно у контрольной культуры на 2 сутки наблюдается фаза ускорения роста и на 3-е сутки культура переходит на фазу экспоненциального роста. При добавлении метилртути в концентрации 1 мкМ лаг--фаза удлинялась

(до 2-х суток), далее наблюдали фазу ускорения роста. В то время, как добавление больших концентраций 10 и 100 мкМ вызывало резкое отмирание клеток в первые 24 часа, далее их количество оставалось стабильно низким (10 мкМ), либо медленно снижалось (100 мкМ).

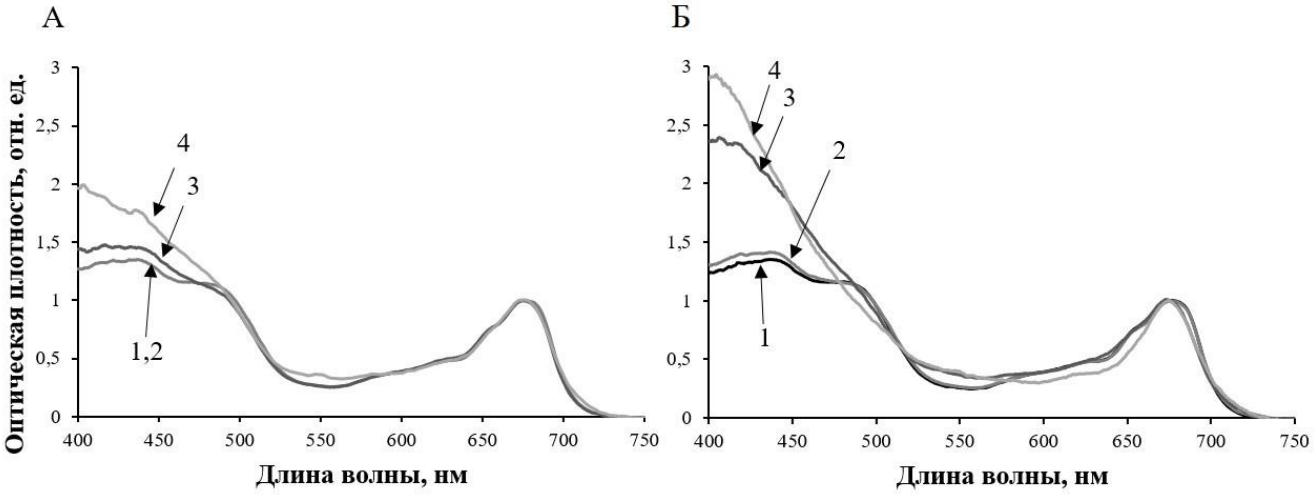

Рис. 9. Спектры поглощения образцов *in vivo* у зеленой водоросли *S. quadricauda* при инкубации с метилртутью 24 часов (А) и 72 часов (Б). Контрольная группа водорослей (1) и инкубированные с метилртутью в различных концентрациях: 1 мкМ (2) 10 мкМ (3) и 100 мкМ (4). Спектры нормированы на красный максимум поглощения хлорофилла *a* при λ=675 нм.

Изучение спектральных характеристик водорослей *S. quadricauda in vivo* после воздействия различных концентраций метилртути, показало, что существуют отличия от контрольной группы. На рисунке 9 спектры поглощения нормированы на красный максимум хлорофилла *a* при длине волны 678 нм. Спектры поглощения контрольных водорослей были типичными для зеленых водорослей с наличием максимумов при 678 нм (хлорофилл *a*) и ≈ 640 нм (хлорофилл *б*) и ряда пиков синем участке спектра при 430-480 нм (пики каротиноидов) (Doucha et al., 1976). Существенных изменений в спектрах поглощения не отмечалось при инкубации с метилртутью менее 24 часов. Однако при более длительной инкубации (более 24 часов) регистрировали относительное увеличение поглощения в области каротиноидов (430–480 нм) по сравнению с контролем, что обычно происходит при воздействии стрессовых факторов (Falkowski, Raven,

1997). Подобные зависимости отмечались в изменении уровня постоянной флуоресценции (F_O), которая с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию пигментов фотосинтетического аппарата клеток водорослей, осуществляющих светосбор световой энергии. Этот параметр рассматривают как косвенный показатель концентрации светопоглощающих пигментов водорослей (Маторин, Алексеев, 2013).

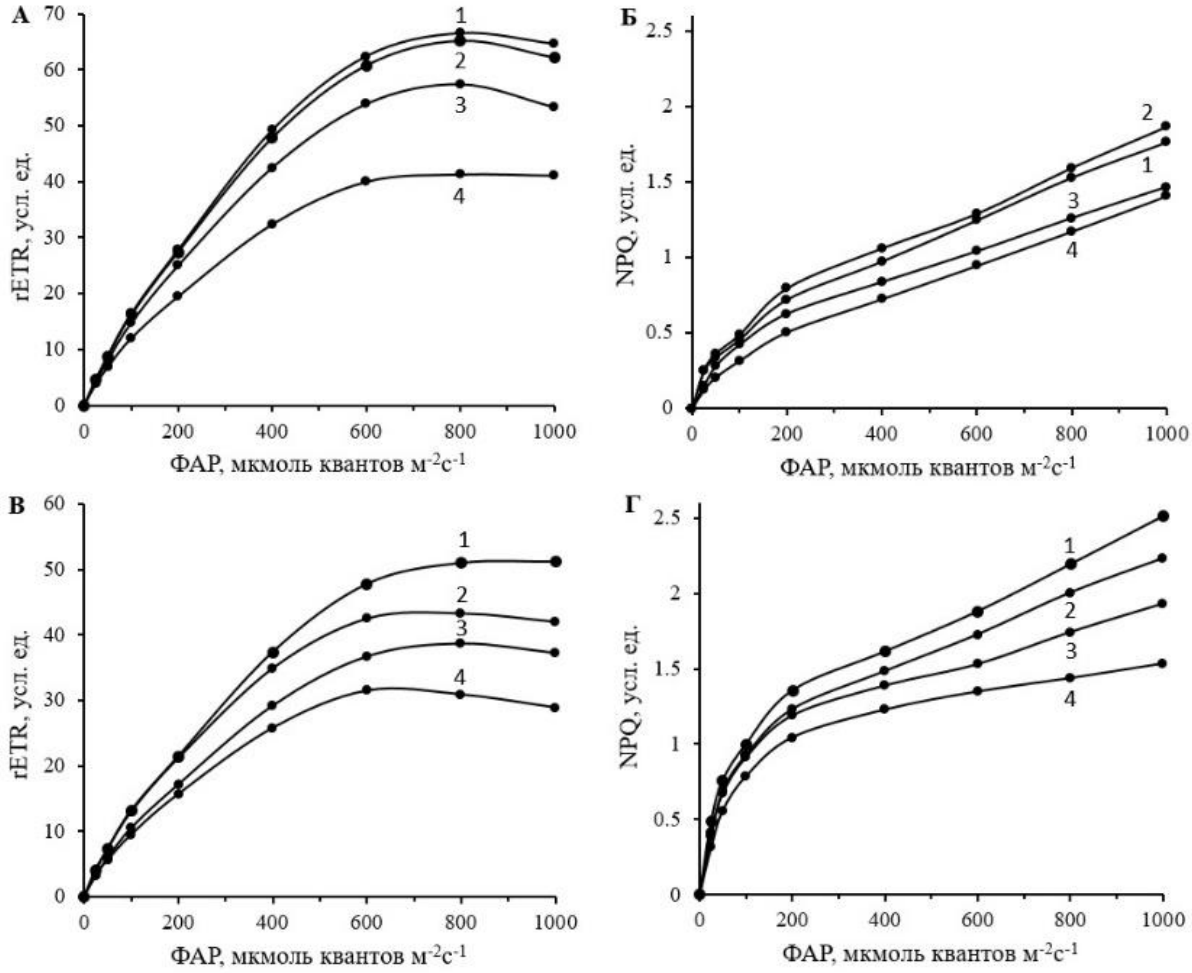

Рис. 10. Кривые изменений параметров флуоресценции в зависимости от интенсивности световой нагрузки (ФАР – фотосинтетически активная радиация) на клетках суспензии водорослей *S. quadricauda*, обработанных метилртутью в концентрациях 0 мкМ (1 контроль), 1 мкМ (2), 10 мкМ (3) и 100 мкМ (4). А, В относительная скорость линейного электронного транспорта rETR и Б, Г нефотохимическое тушение NPQ. А, Б – после 3 ч инкубации с ионами метилртути и В, Г – после 24 ч инкубации с ионами метилртути.

Световые зависимости относительной скорости нециклического электронного

транспорта (ETR) водорослей *S. quadricauda* и *C. moewusii* после инкубации с метилртутью показаны на рисунке 10 и 11. Видно, что в присутствии ионов метилртути в концентрации 1 мкМ (интенсивной культуры водоросли *S. quadricauda*) и 0,1 мкМ (водоросли *C. moewusii*) сильно уменьшается скорость нециклического электронного транспорта ETR. Максимальная скорость электронного транспорта (ETR_{max}) была наибольшей для контрольных групп. После добавления ионов метилртути разных концентраций параметр ETR_{max}.снижался почти во всех образцах, исключая 0,1 мкМ после 3 часов инкубации для водоросли *C. moewusii*. Крайне низкая скорость ETR отмечалась для клеток после суточной инкубации для концентраций 10 мкМ и 100 мкМ метилртути что согласуется с низкими значениями максимального квантового выхода (F_V/F_M) и других важных характеристик первичных процессов фотосинтеза (табл. 1 и приложение 2).

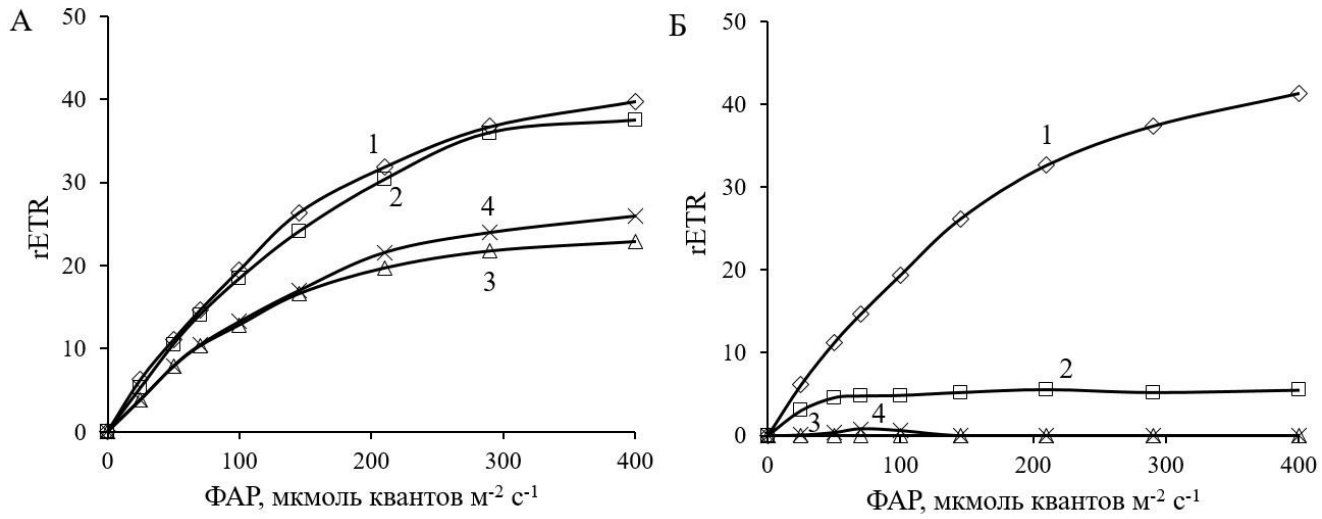

Рис. 11. Изменение параметра относительной скорости электронного транспорта (ETR) в зависимости от интенсивности действующего света в клетках водоросли *C. moewusii*, обработанных метилртутью в концентрации 0,1 мкМ (А) и 0,5 мкМ (Б) при разных временах инкубации. 1 – контроль, 2, 3, 4 – время инкубации с метилртутью – 3, 24 и 48 ч, соответственно.

Параметр описывающий зависимость фотосинтетической активности от освещенности или по другому называется коэффициент максимальной

утилизации световой энергии, представляет собой угол наклона на линейном участке световой кривой ETR (α). Коэффициент максимальной утилизации световой энергии (α) был наибольший у контрольных клеток *C. moewusii* (рис. 12), после добавления метилртути этот параметр снижался. Насыщающая интенсивность света ($E_н$) максимальна для контроля и составляла 204 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$. После добавления метилртути значения насыщающей интенсивности резко уменьшались. Важно отметить, что изменения в коэффициенте максимальной утилизации световой энергии (α) и насыщающей интенсивности света ($E_н$) происходили раньше, чем при регистрации максимального квантового выхода F_V/F_M.

Одним из быстрых механизмом адаптации к условиям высокого освящения является нефотохимическое тушение, активированное энергизацией мембран тилакоида, которая запускает реакцию деэпоксидации виолаксантина (qE), в результате которой увеличивается диссипация энергии в антенных комплексах. Возможны и другие механизмы нефотохимического тушения, такие как переход мобильной антенны из состояния 1 на состояние 2 (qT) (Штирбет и др., 2014). Воздействие концентрации метилртути 1 мкМ на водоросль *S. quadricauda* вызвало при коротких временах инкубации увеличение нефотохимического тушения (NPQ) относительно контрольной группы. Ранее было показано что при концентрации 0,1 мкМ и 1 мкМ при коротких временах инкубации наблюдали повышение данного параметра, которое возможно связано с нарушением фотофосфорилирования в мембранах тилакоида. Воздействие больших концентраций метилртути вызывало сильное снижение нефотохимического тушения, что могло быть связано неспособностью клеток водоросли поддерживать нормальную работоспособность основных функций ФСА, которое в конечном итоге вызвало общее снижение количества живых клеток и снижению содержания хлорофилла. ИФХ от микросекунд до секунды характеризуется быстрым увеличением интенсивности флуоресценции от минимального уровня (F_O или O) до максимального (F_M или P). Появление этого эффекта на свету вызвано с быстрым закрытием РЦ связи с инактивностью ферментов цикла

Кальвина после темновой адаптации, для активации которых требуются pH 8.8 в строме (Гольцев и др., 2014; Штирбет и др., 2014). В присутствии метилртути на коротких временах инкубации

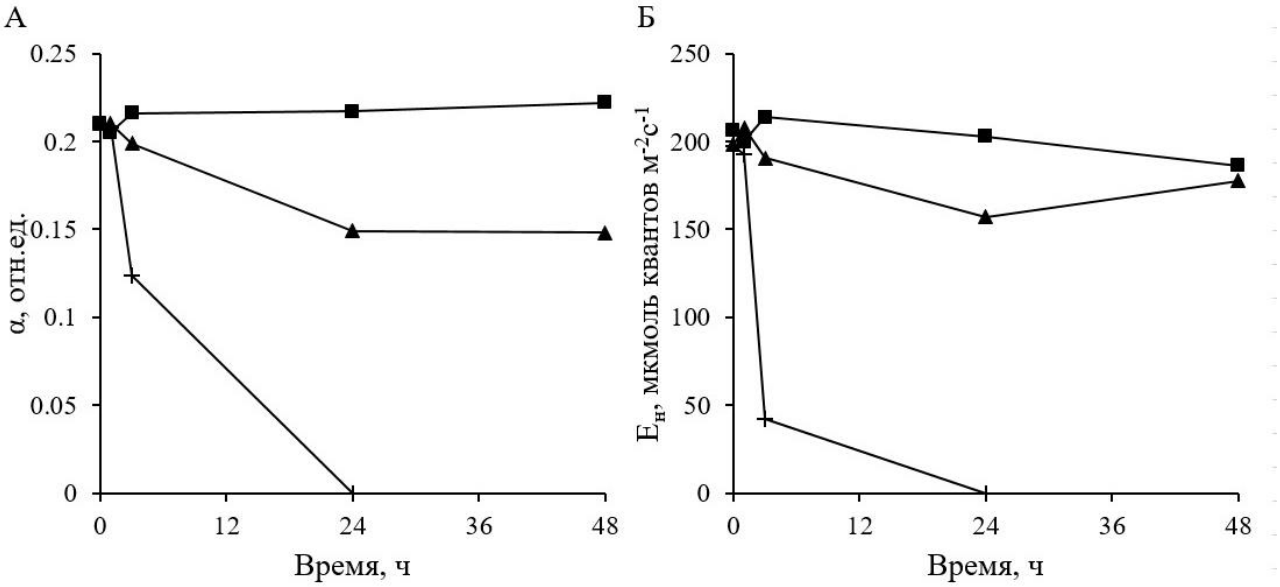

Рис. 12. Изменения параметров световой зависимости флуоресценции относительного электронного транспорта ETR в клетках суспензии *C. moewussii* в зависимости от времени инкубации 2 – контроль, 2, 3 метилртуть в концентрации 0,1 мкМ и 0,5 мкМ, соответственно. А – коэффицент утилизации световой энергии (α) и б – насыщающая интенсивность света ($E_н$).

(3 часа) наблюдали изменение амплитуды и формы индукционных кривых БФ. При воздействии концентраций 10 и 100 мкМ метилртути наблюдали значительное подавление амплитуды фазы ОР ($F_V=F_M-F_O$ переменная флуоресценции), которое показывает снижение фотохимической (разделение зарядов) активности РЦ Р680. Оба параметра F_O и F_M снижались, причем снижение параметра F_M превалировало. Снижение изначального уровня флуоресценции F_O при воздействии тяжелых металлов связывают со структурными изменениями в ССКII (Murthy et al., 1990). В другой работе было показано, что при длительном воздействии метилртути происходило снижение обоих этих параметров у морской диатомовой водоросли *T. weissflogii*, выраженное общим снижением фотохимической активности ФС2 и нарастанием нефотохимического тушения в антенном комплексе ФС2 (Kukarskikh et al., 2003).

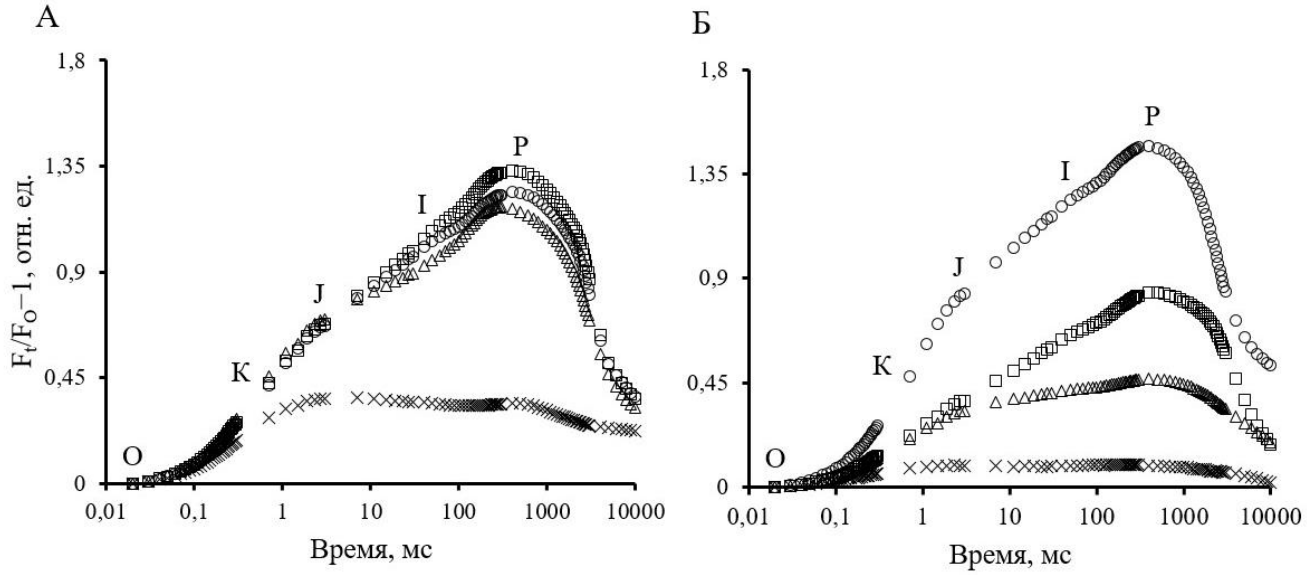

Рис. 13. Индукционные кривые БФ культуры *S. qaudricauda*, измеренные после 3 ч (А) и 24 (Б) ч инкубации в присутствии метилртути. Индукционные кривые представлены после нормирования на начальный уровень O (=F_O) и приведены к нулю ($F_{(t)}/F_O-1$). Контрольная культура водорослей (кружок) и инкубированные с метилртутью образцы при разных концентрациях: 1 мкМ (квадрат) 10 мкМ (треугольник) и 100 мкМ (крест).

В последнее время часто применяется анализ фаз ИФХ, которая представляет из себя полифазную кривую с характерными пиками (перегибами) обозначаемыми как O-J-I-P-переходами. Для корректного сравнения полученных результатов кинетических кривых OJIP применяются различными виды нормировок сигналов. На рисунке 13 видно нормировка сигнала флуоресценции на F_O, которая позволяет при небольшой неоднородности количества клеток водорослей, оценить общую амплитуду фазы O-P.

В присутствии всех концентраций метилртути происходило снижение фазы J-I-P, обусловленной подавлением переноса электрона на пул пластохинонов и далее к акцепторам ФС1, отмечено, что при концентрации 100 мкМ наблюдали сильное подавление всей амплитуды OP (рис. 13А). После 24 часов инкубации с токсикантом наблюдалось общее подавление амплитуды OP у всех концентраций воздействия токсиканта.

Для более детального изучения изменений индукционной кривой при воздействии метилртути был применен так называемый JIP-тест. Результаты

проведенного анализа с помощью JIP-теста показали (табл. 1), что фаза OJ на индукционной кривой БФ, описываемая параметром V_J, была увеличена по сравнению с контролем. Увеличение данного параметра связывают с затруднением переноса электронов далее Q_A^-, которая может быть связано с увеличением доли Q_B-невосстанавливающих центров. Эти центры не способны к восстановлению пула хинонов и реокислению Q_A^- (Strasser et al., 2004). Увеличение доли Q_B-невосстанавливающих центров замедляет скорость реокисления Q_A^-, что отражается на вероятности переноса электронов далее Q_A (ψ_{Eo}) и квантовому выходу электронного транспорта (φ_{Eo}) за пределы Q_A^-. Возможно, такое снижение электронного транспорта в фотосинтетических мембранах связано с воздействием на негемовое железо Fe^{2+} или с Q_B^- связывающим сайтом на ФС2. После суточной инкубации в указанных концентрациях фаза O-J увеличивалась, а также наблюдали небольшой рост фазы O-I, связанный с более быстрым промежуточным восстановлением пула пластохинонов.

Изменение формы кривой на участке O-J является важным источником информации. Для сравнения формы фазы O-J применили двойное нормирование кривой на уровни сигналов F_O (t=20 мкс) и F_J (t=3 мс) и для сравнения кривые нормировали следующим образом $\Delta W_{OJ} = (W_{OJ(метилртуть)} - W_{OJ(контроль)})$, нормированные кривые представлены на рисунке 14. Сравнение кривых флуоресценции хлорофилла опытных образцов и контроля показало, появление пика K, которое происходило на фоне снижения общей амплитуды O-P каждой из фаз индукционной кривой флуоресценции хлорофилла. Общее снижение фазы O-P связано с ингибированием электронного транспорта на донорной стороне ФС2 в результате накопления состояний РЦ $P680^+$, который является сильным тушителем флуоресценции (Govindjee, 1995), который вызывает появление дополнительного K. Повышение параметра TR_O/RC у образцов с метилртутью указывает на рост потока энергии захватываемый РЦ. Ранее было показано другими авторами, что появление пика «K» сопровождается с повышением параметра TR_O/RC при максимальных концентрациях солей меди в среде. Работах

других авторов (Ceppi, 2012; Kalaji, 2014; Strasser et al., 2004) отмечалось, что параметр TR_O/RC может использоваться в качестве индикатора повреждения кислород-выделяющего комплекса. Снижение электронного транспорта на донорной стороне ФС2 при воздействии метилртути, вероятно, обусловлено воздействием метилртути на Mn-

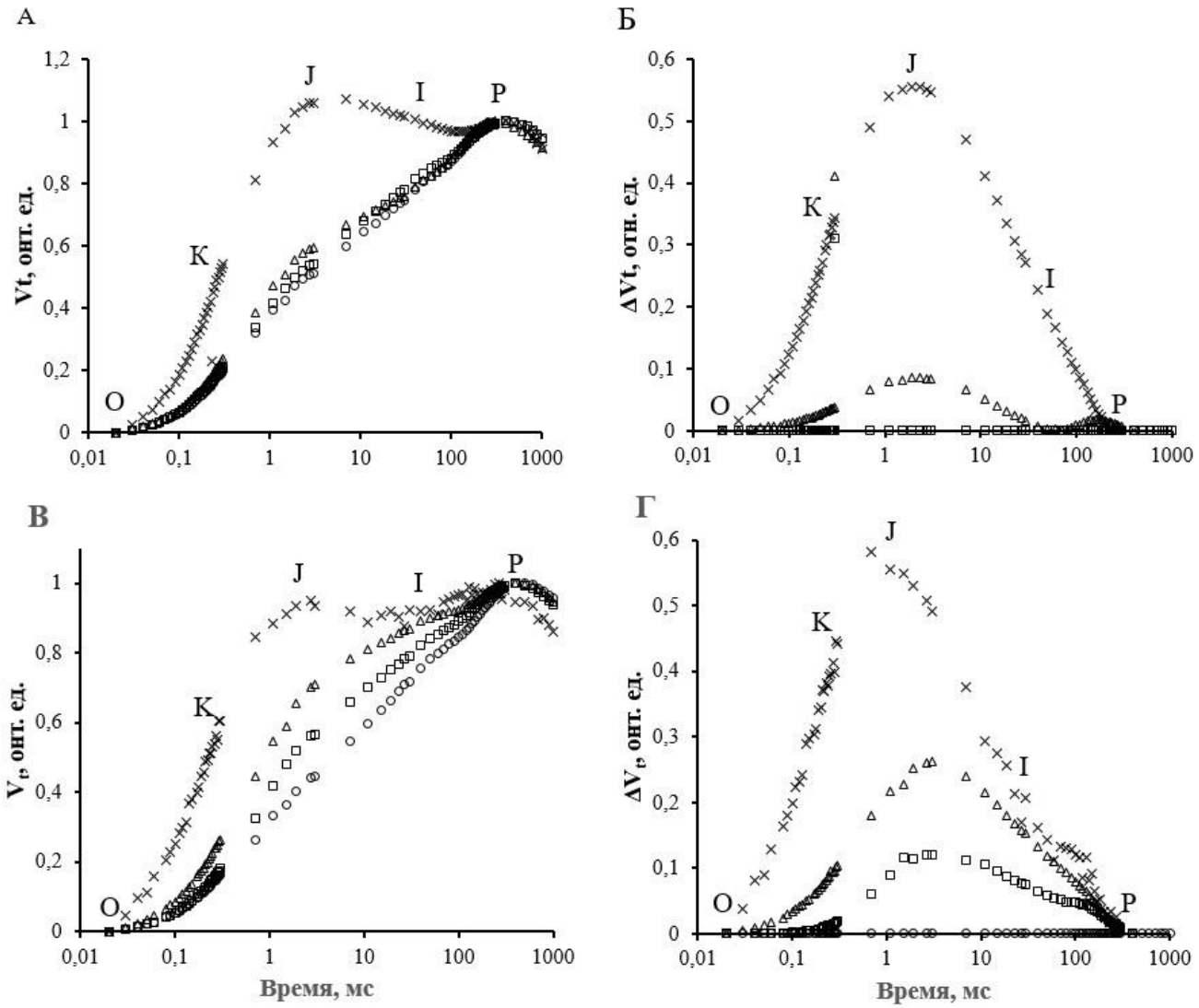

Рис. 14. Индукционные кривые БФ водоросли *S. quadricauda* после инкубации с метилртутью 3 ч (А, Б) и 24 ч (В, Г). Кривые (А, В) нормированы на точки О и Р ($V_t = (F_t - F_O)/(F_M - F_O)$), кривые (Б, Г) получены вычитанием кривой контрольной культуры от опытных группы ($\Delta V_t = (V_{t(\text{метилртуть})} - V_{t(\text{контроль})})$). Контрольная культура водорослей (кружок) и инкубированные с ионами метилртути различных концентраций: 1 мкМ (квадрат) 10 мкМ (треугольник) и 100 мкМ (крест).

кластер и внешние белки КВК, как это происходит при воздействии ионов Hg^{2+} (Bernier, Carpentier, 1995).

Степень сопряженности фотосистем II между собой влияет на сигмоидальность кривой на участке O-J. Было показано, что существуют димерные суперкомплексы (ФС2α), расположенные в гранальных тилакоидах, и мономерные (ФС2β), преобладающие в стромальных ламеллах. Двойное нормирование флуоресценции на уровни O (F_O) и K ($F_{300мкс}$) показало, что районе ~150 мкс наблюдали пик L (рис. 15), появление данного пика показывает

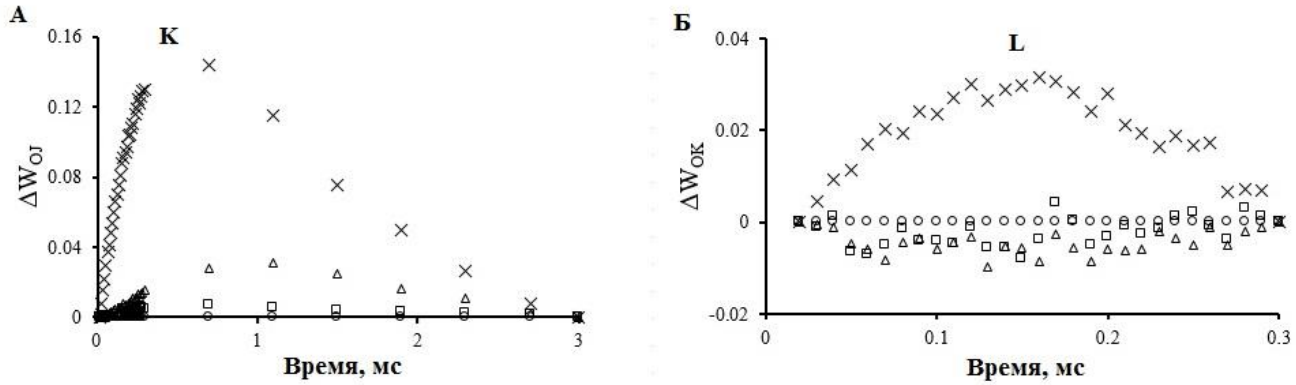

Рис. 15. Начальная кинетика индукции БФ в фазе O-J (А) и начальная кинетика индукции БФ в фазе O-K (Б) водоросли *S. quadricauda* после 3 часов инкубации при концентрации метилртути 100 мкМ (крест), 10 мкМ (треугольник) и 1 мкМ (квадрат).

снижение энергетической связанности между сопряженными ФС2 (Strasser, 2004), т.е. улавливаемая энергия антенными комплексами неактивных РЦ испытывает затруднения в перераспределении на соседние открытые РЦ.

Известно, что реакционные центры ФС2 гетерогенны и различают две группы центров – активные и неактивные (Strasser et al., 2004). Изменение соотношения активных и неактивных центров может напрямую повлиять на ряд параметров таких как ABS/RC, TR_O/RC, ET_O/RC (Xia, Tian, 2009). Воздействие метилртути приводило к снижению количества активных РЦ в ФС2, что наблюдали по увеличению параметра ABS/RC (табл. 1). Параметр ABS/RC показывает поглощенный поток квантов света относительно одного активного РЦ, который также является показателем относительного размера антенны.

Отмечалось, что тяжелые металлы вызывают нарушения в работе РЦ, уменьшая количество активных РЦ, что приводит к увеличению вероятности диссипации поглощенной энергии (Kumar et al., 2014). При воздействии ионов метилртути на водоросли наблюдали увеличение диссипации поглощенной световой энергии в тепло, это проявлялось ростом параметров Dl_O/RC и φ_{Do}, данные параметры отражают отношение рассеивания энергии в тепло к активному РЦ и квантовый выход рассеивания энергии в тепло, соответственно (Strasser et al., 2004). После 24 часов инкубации с ионами метилртути при концентрации 10 и 100 мкМ приводило к значительному увеличению квантового выхода рассеивания энергии в тепло у водорослей (φ_{Do}). Это связывают с ростом доли неактивных РЦ, которая увеличивалась при росте концентраций ионов метилртути, поэтому поглощенная световая энергия не может быть использована в фотосинтезе, а рассеивается в виде тепла антенным комплексом. Неактивные РЦ могут поглощать световую энергию также, как и активные РЦ, но не могут переводить ее в энергию разделенных зарядов, поэтому поглощенная энергия света рассеивается в виде тепла (Strasser et al., 2004). Известно, что процессы нефотохимического тушения имеет разные механизмы возникновения (Pinnola, Bassi, 2018; Malnoë, 2018). После достижения максимальной интенсивности флуоресценции пика P в результате фотосинтетического переноса электронов по электрон-транспортной цепи на мембране тилакоида формируется градиент протонов (ΔpH), которая активирует ферменты ответственные за механизмы возникновения нефотохимического тушения в антенном комплексе. Чаще его называют ΔpH-зависимое нефотохимическое тушение (qE), которая генерируется в зависимости от степени деэпоксидации пигментов в виолаксантиновом цикле в антенном комплексе ФС2 (Holger, 1994; Корнеев, 2002). После 3 ч инкубации с ионами метилртути при концентрации 10 и 100 мкМ наблюдали снижение ΔpH-зависимого нефотохимического тушения, обусловленное развитием pH-зависимого нефотохимического тушения (qE).

Снижение электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 после 3 ч инкубации с ионами метилртути приводило к уменьшению функциональной

активности всей ФС2, это показано низкими значениями индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}). Параметр PI_{ABS} снижался даже при концентрации 1 мкМ, это подтверждает высокую чувствительность данного параметра, которая не раз была показана в других работах не только при загрязнении тяжелыми металлами, но при различных неблагоприятных факторах среды (Appenroth et al., 2001; Oukarroum et al., 2016; Wang et al., 2011).

Присутствие метилртути оказывало у водоросли *S. quadricauda* воздействие на активность РЦ ФС1, что наблюдали по изменению модулированного отражения при длине волны 820 нм. Известно, что ионы ртути воздействует на донорную (Singh, Khare, 1989; Miles et al., 1973) и акцепторную (Mi et al., 2000) сторону ФС1. Одновременная регистрация светоиндуцированных редокс переходов Р700 показала, нарушение редокс процессов Р700 при воздействии метилртути, в тоже время следует отметить, что ФС1 является более устойчивой к токсическому воздействию метилртути чем ФС2. На рисунке 16 представлены светоиндуцированные редокс переходы Р700 зарегистрированные по изменению поглощения при длине волны 820 нм у контроля и экспериментальных проб в виде отношения $MR/MR_0 - 1$. Видно, что в контрольной пробе наблюдали две типичные фазы на индукционной кривой, связанные с начальным окислением Р700 и последующим его восстановлением, тогда как в присутствии метилртути наблюдали изменения в редокс активности Р700.

Было получено, что кинетика светоиндуцированных изменений Р700 РЦ ФС1 после 3-х часовой инкубации с метилртутью при концентрации 10 мкМ максимальная скорость окисления РЦ Р700 (V_{ox}) замедляется на 10% по сравнению с контрольной группой, тогда как при концентрации метилртути 100 мкМ скорость окисления центров замедлялась почти в 2 раза (табл. 1 и рис. 17). Однако же при воздействии метилртути в концентрации 1 мкМ после 3-х часовой инкубации Р700

скорость окисления не снижалась, что говорит о большей устойчивости акцепторной части ФС1 к ионам метилртути, чем акцепторная сторона ФС2.

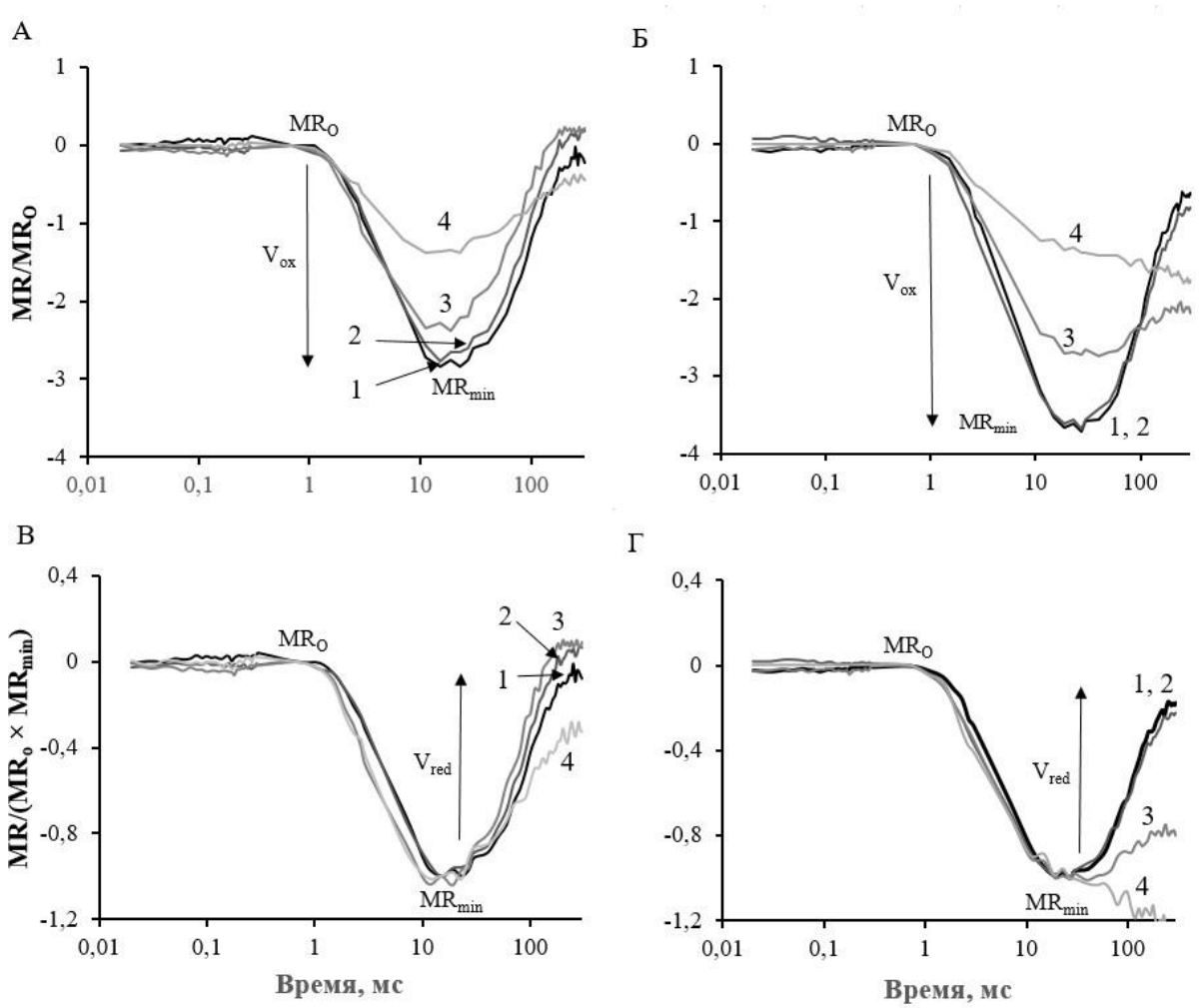

Рис. 16. Окислительно–восстановительные превращения Р700 РЦ ФС1 у водоросли *S. quadricauda* при инкубации с метилртутью в течение 3 ч (А) и 24 ч (Б). Контрольная культура водорослей (1) и инкубированные с метилртутью образцы различных концентраций: 1 мкМ (2) 10 мкМ (3) и 100 мкМ (4). Все кривые модулированного отражения (MR_t) нормированы на начальное значение MR_O (интенсивность при t=0,7 мс) и приведены к нулю.

После 3-х инкубировались ионами метилртути в присутствии 10 и 100 мкМ снижалась скорость восстановления РЦ $P700^+$ (параметр V_{red}), ингибирование скорости восстановления РЦ ФС1 по большей части связано с нарушением электронного транспорта на ФС2. Это предположение согласовывалось с низкими значениями параметров φ_{Ro}, и φ_{Eo}, которые отражают квантовый выход

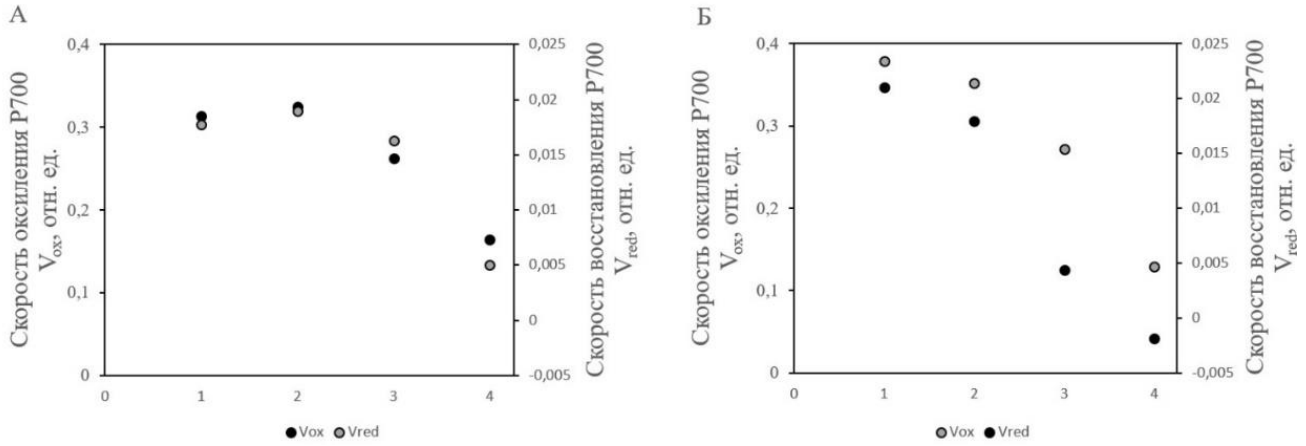

Рис. 17. Максимальные скорости окисления (V_{ox}) и восстановления (V_{red}) P700 *S. quadricauda* после 3-х (А) и 24 (Б) ч инкубации с метилртутью. 1 – контроль; 2 – 1 мкМ; 3 – 10 мкМ; 4 – 100 мкМ.

электронного транспорта далее Q_A, а также квантовый выход восстановления крайних акцепторов на акцепторной стороне ФС1. (табл. 1). Воздействие 10 мкМ приводило к существенному ингибированию восстановления РЦ ФС1, это наблюдалось снижением параметра V_{red}, тогда как при концентрации метилртути 100 мкМ наблюдали практически полное отсутствие восстановления окисленных центров $P700^+$. При увеличении длительности инкубации (24 ч) наблюдали усиление воздействия малых концентраций метилртути (1 и 10 мкМ) на скорость восстановления центров P700.

Индукционную кривую ЗФ можно разделить на две кинетические фазы – быструю и медленную (Itoh et al., 1971; Itoh, Murata, 1973; Malkin, Barber, 1978) (рис. 18). Быстрая фаза начинается подъема свечения ЗФ (I_1) и заканчивается минимумом D_2 приблизительно 0,3–0,5 с после начало освещения, затем начинается медленная фаза ЗФ, которая за несколько минут освещения заканчивается достижением светового стационарного уровня S ЗФ (Гольцев и др., 2014). При воздействии метилртути на водоросли *S. quadricauda* наблюдали снижение интенсивности всех пиков ЗФ, тогда как после 3 часовой инкубации в присутствии 1, 10, 100 мкМ метилртути происходило значительное снижение максимума I_1/D_2 (табл. 1). Во время быстрой фазы происходит накопление в ФС2

в состояний $S_3ZP680^+Q_A^-$ и $S_3ZP680Q_A^-$ (Goltsev et al., 2009a), появление этих предшественников ЗФ и подъем энергизации мембраны (Δψ) приводит к росту интенсивности ЗФ. Снижение пика I_1/D_2 в присутствии метилртути свидетельствует о снижении количества этих излучательная состояний и увеличению закрытых РЦ которые не излучают ЗФ и подавлении потенциала (Δψ) на мембране тилакоида. Увеличение времени инкубации до суток приводило ещё более значительному снижению пика I_1/D_2, вплоть до полного ингибирования всех пиков ЗФ (100 мкМ 24 ч). После 3-х часовой инкубации при воздействии 1 и 10 мкМ наблюдали снижение нарастания интенсивности ЗФ пика I_1/D_2 (1 с), относящейся к медленной фазе ЗФ.

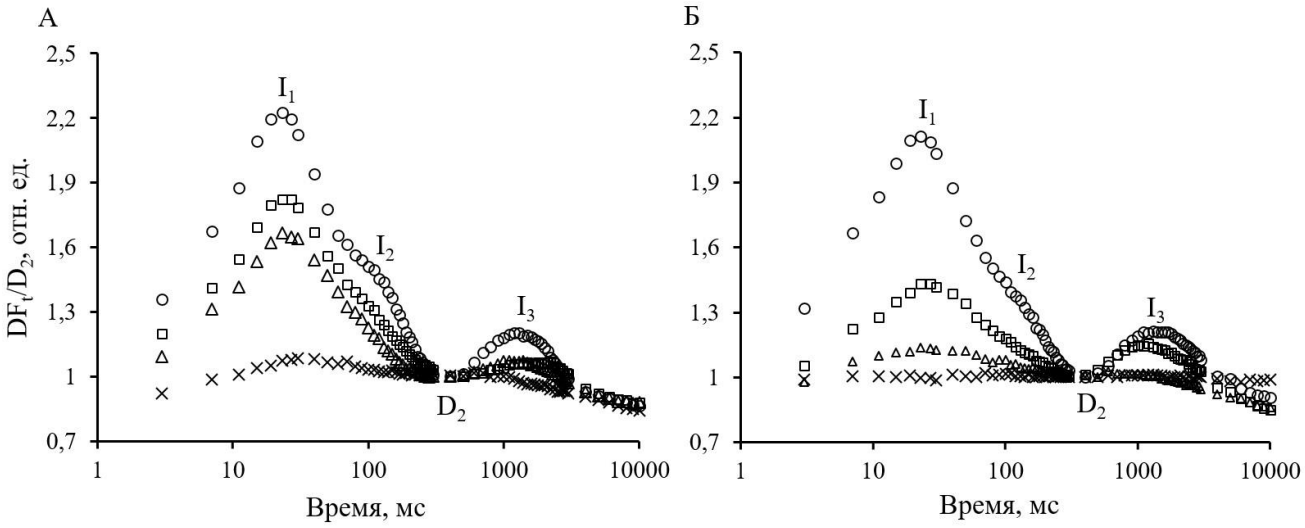

Рис. 18. Индукционные кривые ЗФ у водоросли *S. quadricauda* после инкубации с метилртутью 3 ч (А), 24 ч (Б). Контрольная культура водорослей (кружок) и инкубированные с метилртутью образцы при различных концентрациях: 1 мкМ (квадрат) 10 мкМ (треугольник) и 100 мкМ (крест). Кривые ЗФ нормированы на локальный минимум D2 (при.t≈400 мс).

После суточной инкубации при воздействии 1 мкМ наблюдали значительное подавление на медленной фазы ЗФ при концентрациях метилртути 10 и 100 мкМ. Снижение интенсивности медленной фазы ЗФ показывает уменьшение образования градиента протонов (ΔpH) на мембране тилакоида, известно, что кинетика затухания во время медленной фазы определяется реакциями на донорной и акцепторной стороне ФС2, связанными с

исчезновением S_3-состояний КВК и окислением $Q_B^=$ молекулами пластохинона (Goltsev et al., 2009a).

Отношение F_V/F_M характеризует содержание фотохимически активных центров ФС2, которое характеризует текущий баланс между процессами световой деструкции (фотоингибирования) и репарации белков в ФС2 (Pätsikkä et al., 1998; Vavilin et al., 1995). Фотодеструкция и кинетика восстановления параметра F_V/F_M у водорослей *S. quadricauda*, инкубированных с метилртутью в течении суток представлены на рисунке 19. У водорослей инкубированных с ионами метилртути значительно снижалась скорость восстановления максимального квантового выхода флуоресценции хлорофилла после фотоингибирования интенсивным освещением в течение 45 минут, интенсивность освещения равнялось 1500 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$. Воздействие метилртути на реакцию водоросли на повышенную инсоляцию показало, что после избыточного освящения водоросли подвергавшиеся воздействию метилртути были менее устойчивыми к повышенной

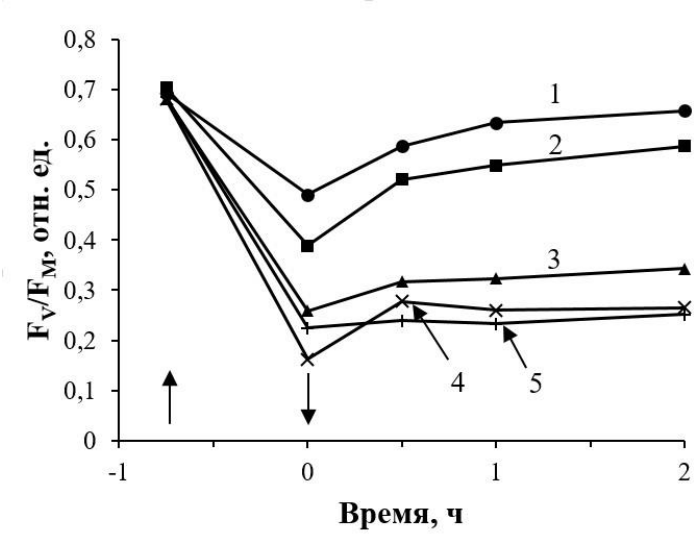

Рис. 19. Изменение параметра F_V/F_M при 45 минутном фотоингибировании светом интенсивностью 1500 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$ и последующем восстановлении при слабом освящении. Контрольная культура зеленых водорослей *S. quadricauda* (1) и водоросли инкубированные 24 часа с метилртутью с концентрацией 1 мкМ (2), 5 мкМ (3) и 10 мкМ (4) и инкубированные с хлорамфеникол 1 г/л (5). Стрелками вверх и вниз отмечены моменты включения и выключения света, соответственно.

интенсивности света, чем контрольная группа. Сила воздействия на водоросли повышенной инсоляции напрямую зависела от увеличения концентрации ионов метилртути на водоросли. Концентрации ионов метилртути 5 мкМ и 10 мкМ значительно снижали скорость восстановления параметра F_V/F_M, тогда как концентрация 1 мкМ ухудшало первоначальное снижение параметра F_V/F_M после повышенной инсоляции. Длительное восстановление параметра F_V/F_M связывают с разрушением D1 белка ФС2, а дальнейшее восстановление в темноте её резинтезом и встраиванием в комплекс белков ФС2 (Nath, Lee, 2014). Для сравнения результатов с метилртутью был выбран модельный токсикант ингибирования синтеза белка хлорамфеникол в концентрации 1 г/л в конечном растворе с водорослями. В результате сравнения метилртуть и хлорамфеникол показали похожее угнетающее воздействие на восстановление параметра F_V/F_M, что указывает на подавление ресинтеза белков ФС2 и выраженному эффекту фотоингибирования (qI).

Таким образом, при концентрации 1 мкМ ионов метилртути воздействие на фотосинтетический аппарат затрагивает преимущественно акцепторную сторону ФС2 и приводит к снижению энергизации фотосинтетических мембран. При увеличении концентрации метилртути выше 10 мкМ обнаружены дополнительные сайты воздействия на донорной стороне ФС2 и акцепторной стороне ФС1.

Таблица 1. Параметры БФ, ЗФ и редокс состояния P700 водоросли *S. quadricauda* после инкубации 3 ч и 24 ч с ионами метилртути. Параметры получены путем анализа кривых полученных на приборе M-PEA-2 (% – процентное изменение от контроля). В таблице представлена медиана выборки при n=5, уровень значимости отличий принят за $p<0,05$(*)

Время инкубации	3 ч				24 ч			
	Контроль	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	Контроль	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ

JIP-test	F_V/F_M	0,62 (100%)	0,57 (92%)	0,54 (87%)	0,27* (44%)	0,59 (100%)	0,46* (77%)	0,32* (53%)	0,09* (15%)
	M_O	0,89 (100%)	0,82 (92%)	0,95 (107%)	2,84* (319%)	0,61 (100%)	0,64 (103%)	1,06* (176%)	2,72* (256%)
	V_J	0,54 (100%)	0,56 (92%)	0,59 (110%)	0,99* (184%)	0,51 (100%)	0,54 (106%)	0,7* (137%)	0,84* (165%)
	φ_{Eo}	0,29 (100%)	0,25* (86%)	0,22* (76%)	-	0,3 (100%)	0,21* (70%)	0,1* (33%)	-
	φ_{Do}	0,38 (100%)	0,43 (113%)	0,46 (121%)	0,73* (192%)	0,41 (100%)	0,54* (132%)	0,68* (166%)	0,91* (222%)
	ABS/ RC	2,66 (100%)	2,57 (97%)	2,98 (112%)	10,63* (400%)	2,0 (100%)	2,58* (129%)	4,73* (237%)	35,98* (1799%)
	PI_{ABS}	0,523 (100%)	0,405* (78%)	0,274* (52%)	0,682 (100%)	0,282* (41%)	0,043* (6%)	0,523 (100%)	0,405* (78%)
	qE	0,63 (100%)	0,65 (104%)	0,65 (103%)	0,36* (58%)	0,63 (100%)	0,63 (99%)	0,45* (72%)	0,54* (86%)
Параметры ЗФ	I_1/D_2	2,23 (100%)	1,82* (82%)	1,67* (75%)	1,07* (48%)	2,09 (100%)	1,43* (68%)	1,39* (67%)	1* (48%)
	I_2/D_2	1,45 (100%)	1,26 (87%)	1,17* (81%)	1,02* (70%)	1,38 (100%)	1,14* (83%)	1,06* (77%)	1,01* (73%)
	1_3/D2	1,27 (100%)	1,06* (83%)	1,05* (83%)	0,96* (76%)	1,21 (100%)	1,15 (95%)	1* (83%)	0,99* (82%)
Параметры P700	V_{ox}	3,71 (100%)	3,68 (97%)	2,72* (80%)	1,4* (48%)	2,84 (100%)	2,77 (99%)	2,28* (73%)	1,36* (38%)
	V_{red}	0,92 (100%)	1,06 (115%)	1,09 (118%)	0,67* (73%)	0,83 (100%)	0,78 (94%)	0,2* (25%)	-0,26* (-31%)

3.2. Индукционные кривые быстрой, замедленной флуоресценции и окислительно-восстановительных превращений P700 водоросли *Scenedesmus quadricauda* при воздействии фенола

При подготовке данного раздела были использованы материалы ранее опубликованных собственных статей в соавторстве (Маторин и др., 2015).

Фенольные соединения присутствуют в отходах целлюлозно-бумажных комбинатов и являются опасными для водной экосистемы (Стом, Бейм, 1976; Федтке, 1985; Huang et al., 2003). Ранее изучена воздействие фенольных производных на изолированных хлоропластах (Holt et al., 1993; Van Rensen, 1989; Vasil'ev et al., 1988). Было показано, что аналоги хинона могут легко связываться с белками ФС2. А действие дифенолов (пирокатехина, гидрохинона, резорцина) пагубно сказывалось на рост культуры клеток, на индукционную кривую флуоресценции хлорофилла (преимущественно на параметр F_V/F_M) и на интенсивность миллисекундной замедленной флуоресценции на водоросли *Chlorella pyrenoidosa*. Однако исследований по влиянию фенола с помощью одновременной регистрации редокс состояний РЦ ФС2 и ФС1, а также энергизации мембран не предпринимались.

Влияние на рост клеток водоросли *S. quadricauda* во время роста в контрольных условиях и при добавлении фенола представлены на рисунке 20. Видно, у контрольной культуры после непродолжительной лаг-фазы менее 3 часов наблюдается рост числа клеток, тогда как при действии фенола (10 мкМ) скорость роста культуры водоросли немного снижена, но в целом культура водорослей увеличивало свое число клеток. А при концентрации 0,1 мМ фенола количество клеток начинало снижаться и это было заметно после 24 ч инкубации с фенолом.

Было исследовано влияние фенола на световые реакции фотосинтеза с помощью регистрации флуоресценции хлорофилла. Одним из наиболее часто анализируемых параметров является максимальный квантовый выход (F_V/F_M), который показывает эффективность первичной фотохимической реакции на ФС2,

часто параметр F_V/F_M описывают как эффективность разделения зарядов на РЦ ФС2. Во квантовому выходу можно косвенно оценить эффективность фотолиза воды в КВК (Schreiber, 2004). Как видно из таблицы 3, фенол в концентрациях 1 мМ течение 24 ч инкубации вызывает частичную инактивацию РЦ ФС2, что согласуется с ранее полученными результатам о слабом токсическом воздействии этих соединений на фотосинтетический электронный транспорт у водоросли хлореллы (Matorin et al., 2014).

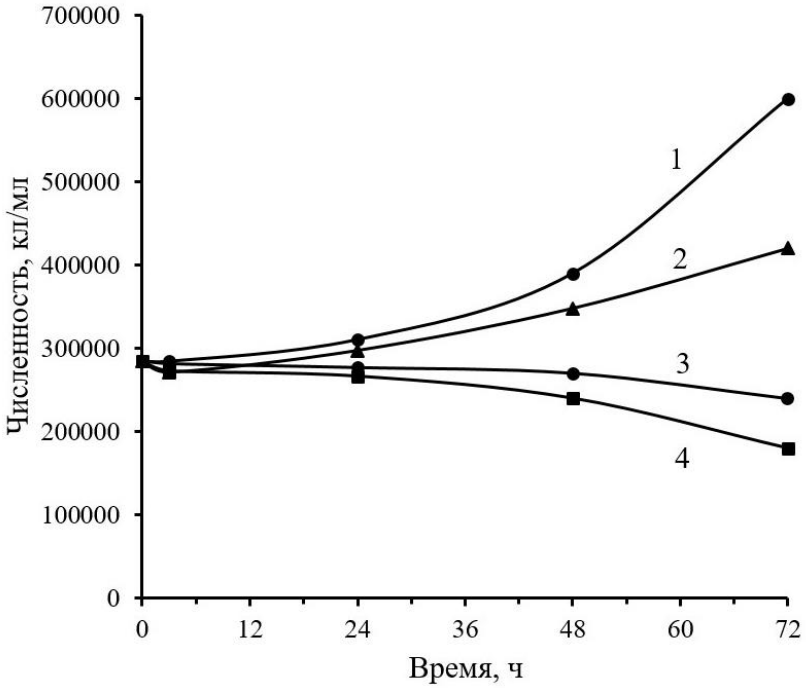

Рис. 20. Ростовые изменения количества клеток у зеленой водоросли *S. quadricauda* инкубированные с фенолом. Контрольная культура водорослей (1) и инкубированные с фенолом в концентрациях: 10 мкМ (2) 0,1 мМ (3) и 1 мМ (4).

Влияние фенола на световые зависимости флуоресценции хлорофилла методом PAM-флуориметрии показало, что воздействие фенола вызывает изменения в световой кривой ETR (рис. 21). Параметры ETR_{max}, коэффициент утилизации световой энергии (α) и интенсивности насыщающей света ($E_н$), приведены в таблице 2. Показано, что воздействие фенола в концентрации 1 мМ снижал параметр ETR_{max}, который показывает максимальную скорость нециклического электронного транспорта на свету. Более того фенол (1 мМ)

снижал коэффициент утилизации световой энергии (α), а также интенсивность насыщающего света ($E_н$) (табл. 2).

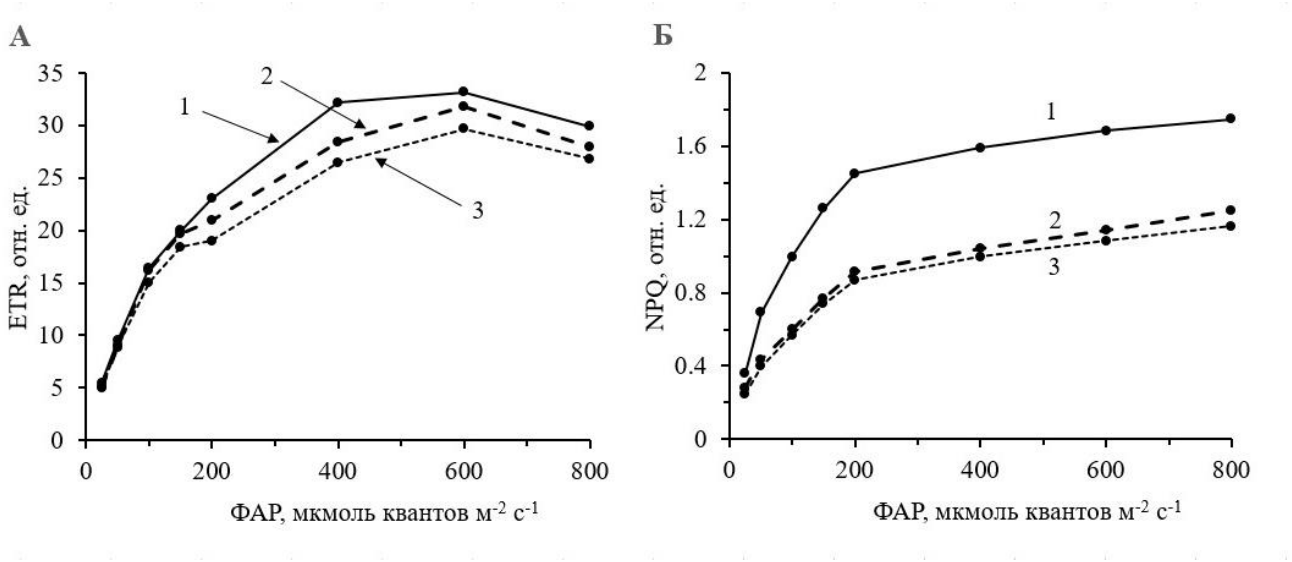

Рис. 21. Параметры флуоресценции в зависимости от световой нагрузки суспензии клеток *S. quadricauda.* Относительная скорость нециклического электронного транспорта (ETR) (А), нефотохимическое тушение (NPQ) (Б). Контрольная культура водорослей (1) и водоросли, инкубированные с фенолом в концентрациях 0,1 мМ (2) и 1 мМ (3). Продолжительность инкубации с фенолом 24 ч.

Известно, что изменение параметра ETR по большей мере связано с изменением квантового выхода на свету Yield (Y). Уменьшение параметра Y с увеличением освещения связанно с регуляторными механизмами, которые активируемыми при избыточности поглощаемой световой энергии. Такими как уменьшением эффективности антенного комплекс, развитие в ней стойкого нефотохимического тушения не связанного с PsbS белком и ΔpH (qH) или же частичным отсоединением антенного комплекса, которая приводит к снижению относительного размера антенного комплекса (уменьшение α) и закрытием РЦ (снижение ETR_{max}).

Процесс, который конкурирует на ровне с фотохимией (Y) за поглощенную световую энергию является нефотохимическое тушение (NPQ) (Schreiber, 2004). Развитие нефотохимического тушения внутри клеток водорослей значительно уменьшается при воздействии фенола на свету даже при самых низких

концентрациях (рис. 21). Снижение параметра NPQ может быть связано с нарушением образования протонного градиента (ΔpH) в сочетании нарушением фотофосфорилирования, которая приводит к снижению быстрых адаптационных процессов таких как qE.

Таблица 2. Параметры световых зависимостей флуоресценции клеток *S. quadricauda* в контроле и после добавления фенола (24 ч инкубации). Статистически значимый уровень отличий между опытным образцом и контролем принимали за $p<0,05$(*)

Параметры	Контроль	Фенол 10 мкМ	Фенол 0,1 мМ	Фенол 1 мМ
NPQ при 200 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$	1,455 (100%)	1,435 (99%)	0,908 (62%)*	0,885 (61%)*
NPQ при 800 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$	1,757 (100%)	1,750 (100%)	1,252 (71%)*	1,166 (66%)*
ETR_{max}	33 (100%)	32,7 (99%)	31,7 (96%)	29,7 (90%)*
α	0,195 (100%)	0,195 (100%)	0,192 (98%)	0,187(96%)*
$E_н$, мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$	169 (100%)	168 (99%)	165 (98%)	159 (94%)*

На рисунке 22 показана индукционная кривая быстрой флуоресценции хлорофилла, так называемые O-J-I-P-переходы. Исходные кривые OJIP-кривой были нормированы на минимальный уровень флуоресценции (F_O) и приведены к нулю, то есть кривые представлены как F_t/F_O-1, где F_t интенсивность флуоресценции на свету в момент времени t. Принято считать, что в момент начального уровня флуоресценции в точке О все РЦ ФС2 вакантны, а все переносчики Q_A находятся в окисленном состоянии. Далее фаза нарастания

флуоресценции O-J отражает уменьшение окисленных форм Q_A, а последующие этапы роста в основном отражают дальнейшее накопление Q_A^-, поскольку его повторное окисление подавляется при снижении количества акцепторов Q_B и пула хинонов. Снижение интенсивности флуоресценции после максимума P (F_M) обусловлено активацией процессов нефотохимического тушения (qE, qT, qI) (Malnoë, 2018) и активацией ферментов цикла Кальвина (Strasser et al., 2004). Действие фенола оказывало влияние на форму кривой OJIP, для анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза применили JIP-тест.

Обработка кривых БФ о стандартной процедуре JIP-теста выявили значительные изменения при воздействии фенола в концентрации 1 мМ (3 ч инкубации) на водорослевые клетки (табл. 3). В частности, снизился квантовый выход электронного транспорта далее Q_A (φ_{Eo}), ингибирование обусловлено ухудшением переноса электрона между Q_A и Q_B (ψ_O). Предполагается, что увеличение фазы O-J отражает накопление восстановленных форм как Q_B-восстанавливающих, так и Q_B-невосстанавливающих центров ФС2 (Strasser et al., 2004). Тот факт, что диурон, ингибирующий электронный транспорт между акцепторами Q_A и Q_B, вызывает быстрый рост флуоресценции почти до максимального уровня за 2-3 мс, за время появления пика J. Анализ данных показал, что воздействие фенола приводит к увеличению доли Q_B-невосстанавливающих центров, которые также неспособны окислить пул хинонов (V_J). Этот вывод подтверждается другими параметрами, таких как параметр M_O (табл. 3), который показывает начальную скорость закрытия центров, так как перенос электрона далее Q_A^- затруднен РЦ в результате быстрее закрываются. Относительная амплитуда фазы J-I-P характеризует вероятность переноса электрона от Q_A к пулу PQ и её уменьшение при воздействии фенола обуславливает ухудшение электронного транспорта на данном участке (Antal et al., 2009). Спад флуоресценции после максимума F_M (P) использовали для получения оценки вклада pH-зависимого нефотохимическое тушения (qE). Данные показали, что pH-зависимое нефотохимическое тушение уменьшается

при воздействии фенола, что однозначно указывает влияние фенола энергизацию мембраны тилакоида.

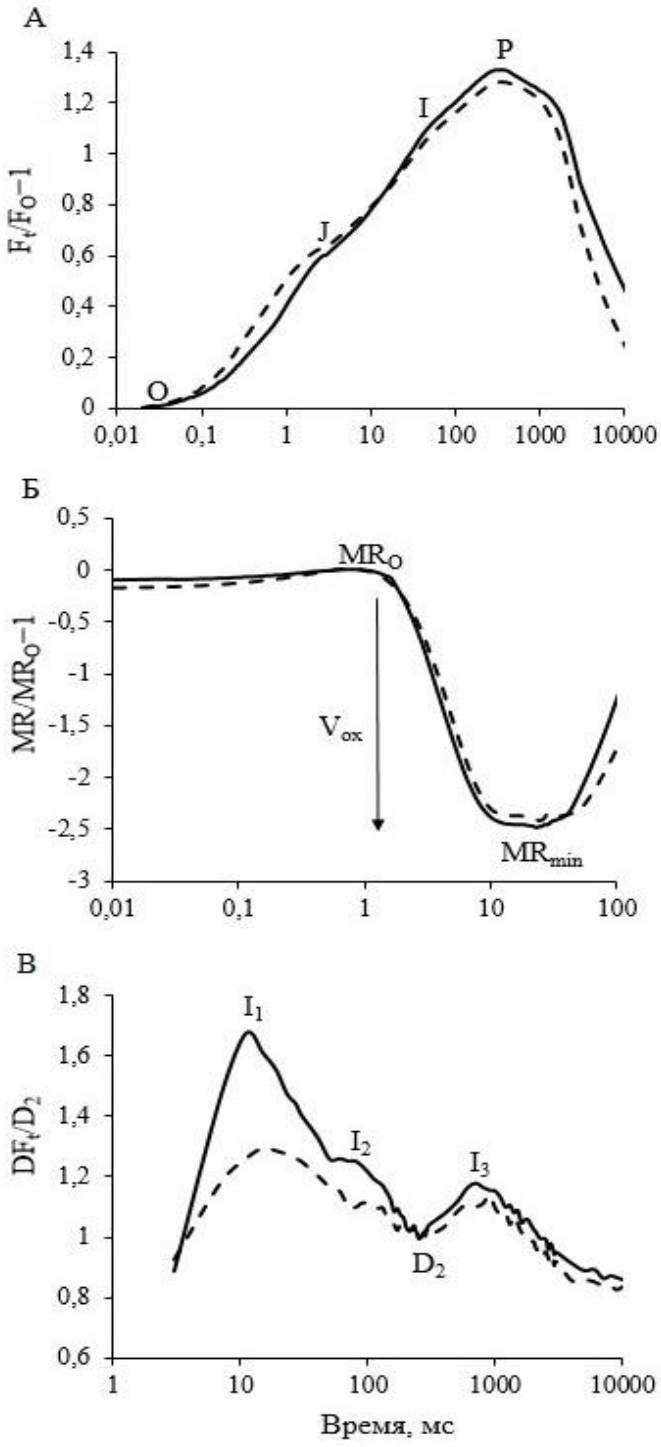

Рис. 22. Индукционные кривые БФ (А), редокс превращений Р700 РЦ ФС1 (Б) и ЗФ (В) водоросли *S. quadricauda* после 3 ч инкубации с фенолом. Контрольная (сплошная линия) и с фенолом в концентрации 0,1 мМ (пунктирная).

Регистрация кинетики окислительно - восстановительных превращений РЦ ФС1 проводилось косвенно по изменению в отражении при длине волны 820 нм модулирующим светом (рис. 22Б). Считается, что у темно-адаптированных клеток водорослей при включении насыщающей вспышки вызывает окисление РЦ Р700, затем происходит постепенное восстановление $P700^+$ электронами, поступившими с электрон-транспортной цепи. В действительности эффективность электронного транспорта на ФС2 и редокс состояния Р700 взаимосвязаны. Окисление РЦ Р700 выходит плато (MR_{min}) примерно между фазами J-I в индукционной кривой БФ, которое отражает уменьшение количества окисленных переносчиков между фотосистемами. Поступление электронов со стороны ФС2 и

стромальных доноров вызывает восстановление РЦ ФС1, вызывая рост кривой редокс состояния Р700. Поскольку отсутствует отток электронов со стороны акцепторов ФС1 кривая выходит на плато восстановления Р700 РЦ (на рисунке 22 не показано) (Goltsev et al., 2009a; Klughammer, Schreiber, 2000). Далее освещение клеток водорослей вызывает вторую волну окисления Р700, что объясняется оттоком электронов из ФС1 после активации ФНР и ферментов цикла Кальвина-Бенсона (Маторин, Алексеев, 2013).

Воздействие фенола на клетки водоросли не снизило скорость окисления Р700, но последующее восстановление замедлялось вследствие ингибирования электронного транспорта между фотосистемами. Такие изменения особенно ярко выражены в течение 10 с и согласуются с увеличением доли Q_B-невосстанавливающих центров ФС2 (V_J) (Matorin et al., 2014).

Миллисекундная ЗФ возникает в результате вторичной рекомбинации зарядов и её интенсивность напрямую зависит от электрохимического потенциала на мембране тилакоида (Goltsev et al., 2009a), с помощью которого можно оценить энергизацию фотосинтетических мембран (ΔpH и Δψ). Разделяют два участка в индукционной кривой ЗФ это быстрый участок (с характерными пиками I_1 и I_2) и медленный участок (с пиками I_3 и т. д.). Характерная индукционная кривая ЗФ представленная в диапазоне затухания 0,01-0,99 мс состоят из двух основных пиков: I_1 – быстрый пик появляющийся при 3-10 мс и I_3 – медленный пик появляющийся в секундном диапазоне (в разное время у разных авторов по разному нумеруют) (Гольцев и др., 2014). Появление быстрого максимума I_1 ЗФ приходиться между фазами J-I на индукционной кривой БФ. Рост ЗФ (I_1) обусловлено накоплением определенных редокс-состояний, ответственных за рекомбинацию заряда и эмиссию квантов ЗФ, а также путем усиления формирования ЗФ за счет «электрического потенциала» на мембране (Δψ), образующегося в результате электронного транспорта и образования положительного заряда с внутренней стороны мембраны, а именно связанное с S_3-состоянием КВК. Далее интенсивность ЗФ спадает за счет закрытия РЦ и снижения количества излучательных рекомбинантных пар. Появление

промежуточного пика I_2 связано с активностью ФС1 и которая отнимает электроны с пула хинонов, тем самым окисляя её, которая в свою очередь ведет к открытию РЦ и усилению свечения ЗФ. Медленный пик (I_3) в секундном диапазоне связан с фотоиндуцированным образованием трансмембранного протонного градиента (ΔpH), которое усиливает формирование свечения ЗФ.

Для удобства сравнения индукционные кривые ЗФ были нормированы на локальный минимум D_2, который возникает при закрытии всех РЦ в фазе P индукционной кривой БФ (рис. 22В).

В таблице 3 показано, что фенол при концентрации 0,1 мМ подавлял все пики ЗФ. Отмечено, что сила воздействия фенола на пики была не равнозначной, фенол значительно сильнее снижал пик I_1/D_2, что было отмечено ранее (Matorin et al., 2014). Полученные результаты позволяют предположить, что фенол сильнее влияет на электрическую составляющую (Δψ) электрохимического потенциала мембраны тилакоида.

Таким образом, воздействие фенола отличается от воздействия ионов метилртути. При концентрации 0,1 мМ фенол снижает энергизацию мембраны (I_1/D_2), а именно электрическую (Δψ) компоненту электрохимического градиента. При увеличении концентрации фенола (1 мМ) помимо снижения энергизации мембраны тилакоида появляется дополнительный сайт воздействия — это акцепторная сторона ФС2 (φ_{Eo}, V_J). Выявлено, что фенол практически не воздействовал на акцепторную сторону ФС1.

Таблица 3. Параметры флуоресценции (БФ, ЗФ) водоросли *S. quadricauda* после 3-х ч инкубации с различными концентрациями фенола. В таблице представлена медиана выборки при n=5, уровень значимости отличий между контролем и опытными образцами принят за p<0,05(*)

Параметры	Контроль	Фенол		
		10 мкМ	0,1 мМ	1 мМ
F_V/F_M	0,724 (100%)	0,710 (98%)	0,712 (98%)	0,702* (96%)
qE	0,43 (100%)	0,42 (97%)	0,34 (79%)	0,32 (74%)*
M_0	0,32 (100%)	0,32 (100%)	0,35 (109%)	0,41* (128%)
ψ_O	0,661 (100%)	0,663 (100%)	0,641 (97%)	**0,602* (91%)**
φ_{Eo}	0,479 (100%)	0,471 (98%)	0,456 (95%)	**0,423* (88%)**
PI_{ABS}	3.92 (100%)	3.60 (92%)	**3.22 (82%)**	**2.43* (62%)**
I_1/D_2	1,68 (100%)	**1,51 (90%)**	**1,26* (75%)**	**0,91* (54%)**
I_3/D_2	1,18 (100%)	1,17 (100%)	1,15 (97%)	0,91* (77%)

3.3. Характеристики фотосинтетического аппарата пигментного мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124y-1

При подготовке данного раздела были использованы материалы ранее опубликованных собственных статей в соавторстве (Садвакасова и др., 2016; Маторин и др., 2016).

Основным современным направлением развития биомониторинга является использование различных тест-объектов в биотестировании. Биотестирование, используемое в качестве экспресс-метода оценки токсичности водной среды, дает возможность, с одной стороны, по конкретным цифровым данным охарактеризовать уровень токсичности среды для организмов на количественной основе; с другой стороны, по оценке стабильности генетического материала под воздействием антропогенной нагрузки позволяет выявить в окружающей среде мутагенные факторы, своевременное обнаружение которых позволяет принять меры по снижению их негативного действия на живые организмы (Заядан, Маторин, 2015). Методологической основой современного генетического мониторинга является создание быстрых и эффективных тест-систем, позволяющих оценивать различные нарушения генетического аппарата, возникающие под действием факторов окружающей среды. В связи с этим поиск новых представительных тест-объектов, перспективных для прогнозирования генетических последствий действия факторов окружающей среды и изучение их эколого-биологических особенностей представляется актуальным.

Удобными модельными объектами для выявления действия различных факторов (в том числе и мутагенных) на популяции по их влиянию на активность фотосинтеза являются водоросли (Zaydan et al., 2014). Зеленая одноклеточная водоросль хламидомонада (*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard) является модельным объектом в генетике фотосинтеза, и изучение последствий действия мутагенных веществ на ее исходные и мутантные штаммы представляет интерес не только в плане расширения наших знаний о биологическом действии факторов, загрязняющих экосистемы, но и для создания тест-систем для генетического

мониторинга объектов окружающей среды. Преимуществом использования пигментных мутантов в биотестировании водной среды является возможность определения не только токсичности загрязненной воды, но и ее потенциала мутагенности. Так, используя пигментный мутант, характеризующийся желтой окраской, при биотестировании исследуемой воды и регистрируя возникновение ревертантов зеленого цвета, характерного для исходного штамма, можно проводить оценку состояния водных экосистем на наличие мутагенов. Ранее были показаны возможность и достоинства использования пигментного мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-124y-1) для оценки мутабильности проб воды при мониторинге состояния окружающей среды (Садвакасова и др., 2016; Маторин и др., 2016).

Работы по изучению влияния радиационного излучения на пигментный состав зеленых водорослей и растений широко представлены в литературе (Xue et al., 2005; Zayadan et al., 2014). Известно, что содержание пигментов и их состояние являются интегральным показателем, который определяет не только развитие и активность фотосинтетической системы, но и течение других ферментативных реакций, т.е. характеризует продуктивность, жизнеспособность и стойкость организма (Rastogi et al., 2014). Под воздействием УФ лучей происходит нарушение функционирования пигментных систем растительных организмов, изменяется состав и количество пигментов. Показано, что в результате облучения в клетках растений подавляется синтез хлорофилла и происходит его фотодеструкция (Moon et al., 2012; Rastogi et al., 2014). Отмечалось чувствительность синтеза хлорофилла *а* к мутагенам любой природы (Han et al., 2009). В то же время воздействие УФ на хлорофилл *б* считается более слабым и при этом, одновременно, менее изученным. УФ уменьшает величину отношений хлорофилл *б* / хлорофилл *а*, а также хлорофиллы / каротиноиды (Воронова и др., 2009).

Штаммы были близки также по спектральным и флуоресцентным параметрам. На рисунке 23 приведены спектры поглощения дикого штамма (CC-124) и мутантного штамма *C. reinhardtii* CC-124y-1. Эти спектры нормированы на

красный максимум поглощения хлорофилла *а* при 675 нм. У мутантного штамма СС-124у-1 по сравнению с диким типом наблюдается значительное снижение поглощения в области 650 нм, что указывает на снижение в несколько раз количества хлорофилла *б* по сравнению с хлорофиллом *а*. Это также подтверждается данными, полученными при измерении спектров возбуждения флуоресценции (рис. 23Б). На спектрах поглощения мутанта СС-124у-1 отмечалось также снижение поглощения в области каротиноидов (470–480 нм) (рис. 23А). Эти изменения в области каротиноидов у мутантного штамма были еще сильнее выражены в спектрах возбуждения флуоресценции. Это показывает, что у мутанта СС-124у-1 также существенно снижено содержание каротиноидов.

Известно, что каротиноиды в водорослях не флуоресцируют, но эффективно переносят энергию возбуждения на хлорофилл *а*, который является основным источником флуоресценции. Существенное уменьшение в области 480-500 нм в спектре возбуждения флуоресценции по сравнению со спектрами поглощения у мутанта СС-124у-1 показывает, что у него ослаблена связь каротиноидов с хлорофиллом *а*, антенного комплекса и выполняют экранирующую роль.

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей, начинают использовать методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (начиная с 10 мкс) при возбуждении интенсивным светом (Гольцев и др., 2014; Маторин, Рубин, 2012). На приборе M-PEA-2 появилась возможность наряду с регистрацией флуоресценции измерять и изменения поглощении при 820 нм и оценивать редокс состояние Р700 (пигмент РЦ ФС1). То есть прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями, протекающими в ФС2 и в ФС1 (Гольцев и др., 2014; Маторин, Рубин, 2012; Strasser et al., 2010). Более того, прибор регистрирует индукционные изменения замедленной флуоресценции.

Для более детальной оценки изменений фотосинтетической активности в клетках мутантов были измерены индукционные кривые БФ и ЗФ, а также редокс

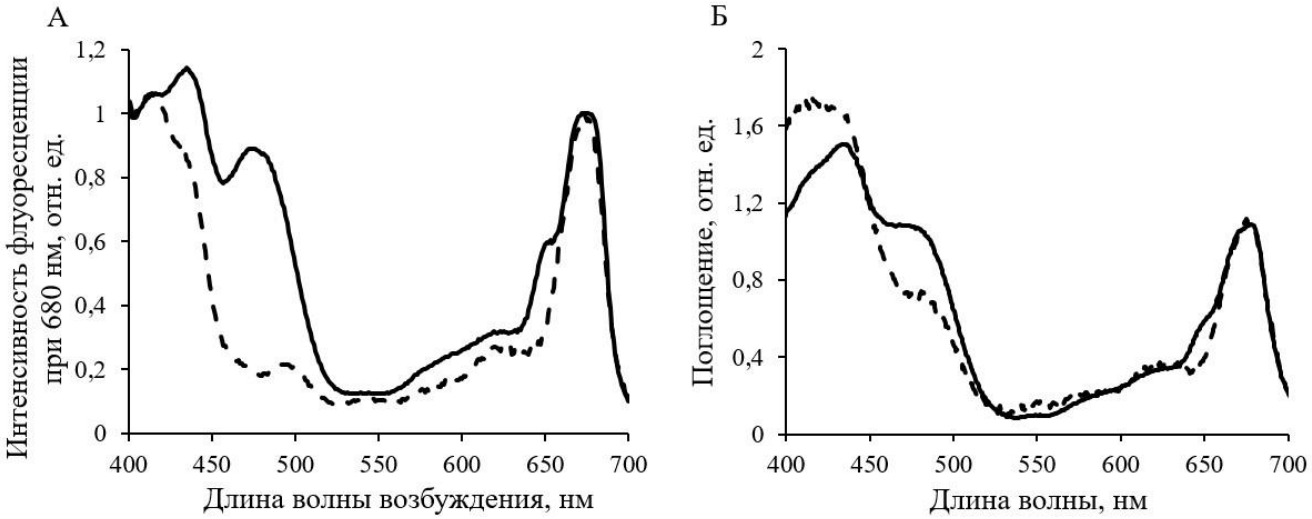

Рис. 23. Спектр возбуждения флуоресценции при длине волны регистрации 680 нм (А) и спектр поглощения (Б) водоросли *C. reinhardtii*. Сплошной линией представлен дикий тип *C. reinhardtii* CC-124, а штриховой линией мутантный тип CC-124y-1. Спектры поглощения и возбуждения флуоресценции нормированы на красный максимум хлорофилла *a* при длине волны 675 нм.

состояния P700 на приборе M-PEA-2. На рисунке 24A представлены кривые БФ после включения света, нормированные на минимальный уровень флуоресценции F_O (O). У клеток дикого типа кривая флуоресценции соответствовала кривой, описанной ранее в литературе (Lazár, Schansker, 2009). В кинетике индукции флуоресценции в ответ на свет высокой интенсивности обычно наблюдается несколько стадий, известных как O-J-I-P переходы. Начальный уровень O (Origin) соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при «открытых» РЦ ФС2 (F_O), когда все акцепторы Q_A окислены. Фаза O-J обусловлена светоиндуцированным восстановлением Q_A, тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Q_A, обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления акцепторов Q_B и пула пластохинонов.

Полученные индукционные кривые флуоресценции у мутантного штамма CC-124y-1 отличаются от дикого типа (рис. 24). У мутантного штамма наблюдалось снижение переменной флуоресценции F_V в основном за счет снижения $F_{M,}$ что возможно связано с уменьшением количества активных РЦ,

которая приводит к уменьшению максимального квантового выхода флуоресценции (F_V/F_M).

Для проведения количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров кинетической кривой O-J-I-P использовали параметры JIP-теста (табл. 4), описание и расчет параметров даны в приложении 1. Параметр ABS/RC у мутантных клеток CC-124y-1 увеличен (2,865), что указывает о снижении у мутанта доли «активных» РЦ ФС2 относительно дикого типа (1,485), что согласуется с снижением переменной флуоресценции F_V. Доля Q_B-невосстанавливающих центров ФС2 (V_J) у мутанта был увеличен, а также снижен квантовый выход электронного транспорта далее φ_{Eo}. Также наблюдается снижение параметра V_I у мутанта CC-124y-1, который связывают с затруднением переноса электрона от ФС2 в пул «быстрых» хинонов. В свою очередь это связано со снижением фотохимической активности ФС2 и увеличением доли Q_B-невосстанавливающих центров. Индекс производительности (PI_{ABS}) является показателем функциональной активности ФС2, отнесенный к поглощаемой энергии (ABS). Этот параметр имеет оптимальные показатели у клеток дикого типа напротив мутантный штамм имел несколько сниженные показатели PI_{ABS} Снижение функциональной активности ФС2 связано с низким максимальным квантовым выходом ФС2, а также увеличением доли Q_B-невосстанавливающих центров.

Подобно индексу производительности ФС2 PI_{ABS}, общий индекс производительности PI_{total} (суммарный индекс производительности) учитывает не только функциональную активность ФС2, но и активности крайних акцепторов ФС1. Таким образом, PI_{total} применяться для более широкой оценки слаженности работы двух фотосистем и цепи переноса электронов между ними. Данный показатель также был снижен у мутантного штамма, но в отличии от PI_{ABS} снижение не было столь сильным. Действительности это связано с увеличением эффективности переноса энергии с пула пластохинонов на крайние акцепторы ФС1.

Процессы нефотохимического тушения являются защитными механизмами

от фотоодеструкции фотосинтетического аппарата активными формами кислорода. Квантовый выход рассеивания энергии (φ_{Do}) и ΔpH-зависимое тушение (qE) у мутанта находиться на высоком уровне (табл. 4). Высокие значения данных параметров позволяет предположить хорошие механизмы защиты клеток от повышенной интенсивности света.

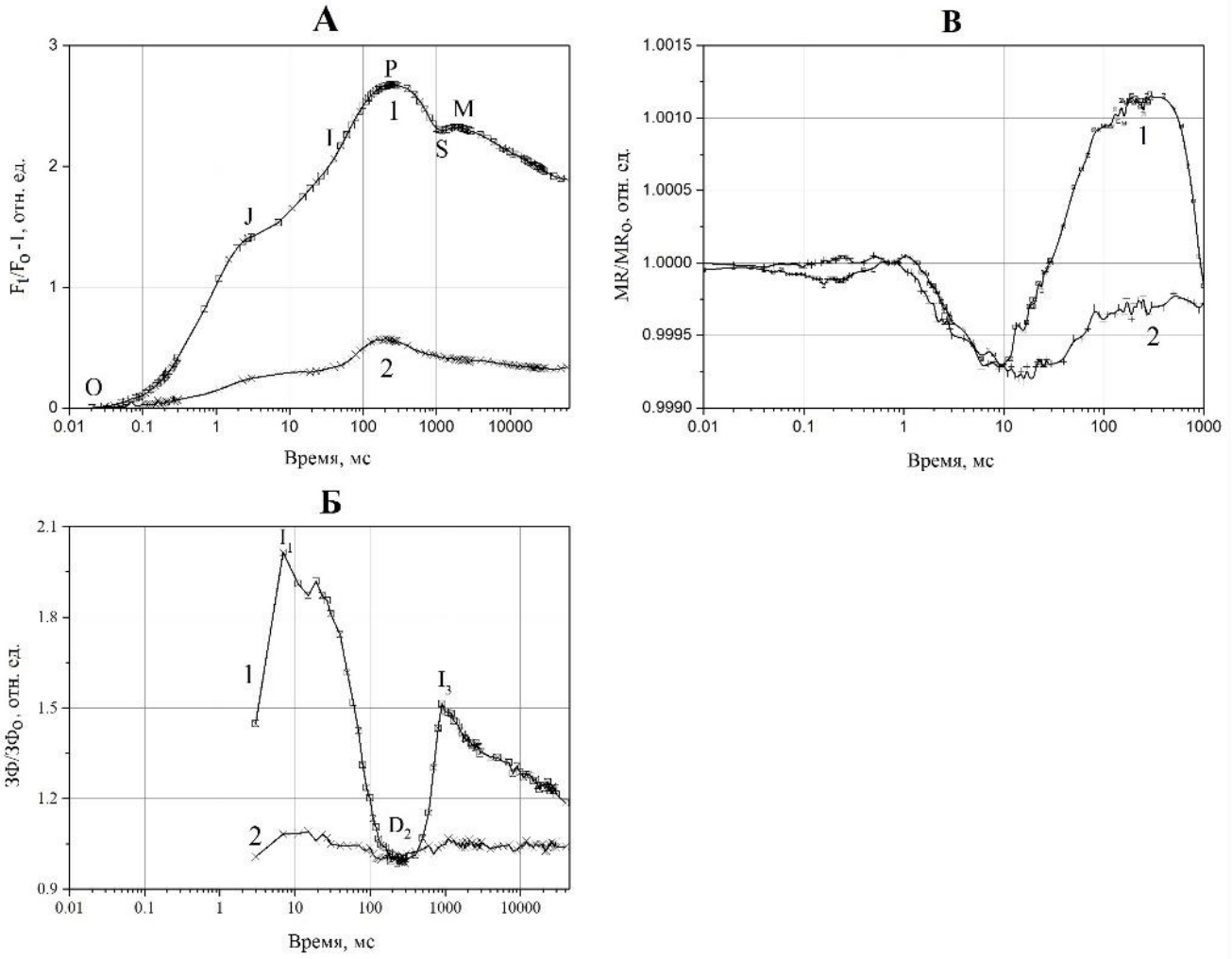

Рис. 24. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (А), замедленной флуоресценции (Б) и модулированного отражения при 820 нм (В): 1- дикий тип (СС-124), 2- мутантный штамп (СС-124у-1) одноклеточных водорослей *C. reinhardtii.* Индукционные кривые быстрой флуоресценции нормированы на FO (при t=0,02 мс), кривые замедленной флуоресценции нормированы на D_2 (при t=280 мс), модулированное отражение было нормировано на MR_O (при t= 0,7 мс).

Одновременное измерение кинетики кривой модулированного отражения при длине волны 820 нм позволяет на нативных объектах следить за редокс

состоянием Р700 РЦ ФС1. У адаптированного к темноте клетки водоросли Р700 находиться в преимущественно в восстановленном состоянии. Включение действующего света приводит к окислению РЦ Р700 (с максимумом накопления $P700^+$ при $t \approx 30$ мс), которое сменяется восстановлением Р700 (рис. 24В). При этом сигналы БФ, отражающие восстановление Q_A (Р), и процессы восстановления Р700 выходят на плато примерно синхронно. Параллельное накопление восстановленных форм Р700 и Q_A отражает восстановление переносчиков на всём участке ЭТЦ между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФС1 в условиях, когда ФНР инактивирована инкубацией в темноте. При длительном освещении (~ 1-10 с) наблюдали вторую волну окисления Р700, которую можно объяснить оттоком электронов от ФС1 при активации ФНР и ферментов цикла Кальвина.

Как видно из рисунке 23 В, мутант СС-124у-1 сохраняет способность к окислению пигмента Р700 при включении света, скорость окисления Р700 практически не отличалось от дикого типа. Однако, у мутанта наблюдалось снижение скорости восстановления Р700, которое связано со слабой активностью электронного транспорта ФС2, это согласуется с данными анализа индукционных кривых БФ.

Индукционная кривая ЗФ возникает в результате вторичной реакции рекомбинации зарядов и её интенсивность зависит от величины электрохимического градиента протонов, а также числа рекомбинантных пар, испускающих кванты ЗФ. Поэтому ЗФ является одним из способов на нативном объекте оценить энергизацию фотосинтетических мембран. Максимум на индукционной кривой ЗФ возникающий при 10-50 мс (I_1) возникает на фазе возрастания J-I индукционной кривой БФ (рис 24А и рис. 24Б). Образование пиков I_1 и I_2 обусловлено накоплением определённых редокс-состояний, отвечающих за обратную рекомбинацию зарядов и испускание квантов ЗФ, а также усилением ЗФ за счёт образующегося электрического потенциала на мембране ($\Delta\psi$). Третий пик ЗФ I_3 – в секундном диапазоне связывают с фотоиндуцированным образованием трансмембранного электрохимического

градиента протонов (ΔpH), которое увеличивает интенсивность высвечивания квантов ЗФ. Эти закономерности рассмотрены во многих работах (Strasser и др., 2010; Zayadan и др., 2014). У мутантного штамма СС-124у-1 значительна снижена интенсивность ЗФ на индукционной кривой при 10-50 мс (пики ЗФ I_1 и I_2), и 1 с (пик ЗФ I_3) (рис. 24Б), что вероятно связано с значительным уменьшением нециклического транспорта и уменьшением энергизации фотосинтетических мембран (Δψ и ΔpH).

Параметры JIP-теста индукционных кривых БФ и параметры ЗФ показали, некоторые отличия мутантного и дикого типа. Наиболее характерные из них для мутантного типа это малый размер относительного антенного комплекса (ABS/RC), а также отличия в квантовом выходе электронного транспорта (φ_{Eo}), а также и индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}). Кроме того, выявлено уменьшение процессов энергизации фотосинтетических мембран у мутантного типа.

Отсутствие хлорофилла *б* значительно снижает эффективность фотосинтеза в клетках мутантов, но было интересным последить реакцию клеток мутантов на световую нагрузку. В результате были получены характерные световые кривые Yield, ETR и NPQ. Как видно из таблицы 4 параметры световых кривых флуоресценции хлорофилла у мутантного типа значительно отличались от дикого типа. Квантовый выход на свету (Yield) является коэффициентом эффективности разделения зарядов на РЦ ФС2 в условиях световой нагрузки. Как видно, дикий тип при слабой интенсивности света 25 ФАР показывает более высокие показатели эффективности разделения зарядов на РЦ, чем мутантный тип (0,598 против 0,319). Повышение интенсивности света до 600 ФАР значительно снижало эффективность разделения зарядов у дикого типа (0.132) чем у мутанта (0,202). Параметр нефотохимического тушения (NPQ) также был выше у дикого типа при интенсивности света 25 ФАР (0,087 против 0,054). Тогда как при интенсивности света 600 ФАР нефотохимическое тушение у мутантного типа было выше чем у дикого типа (0,263 против 0,156). Это показывает, что мутантный тип лучше справляется с повышенной световой нагрузкой, чем дикий тип.

Расчет насыщающей интенсивности света ($E_н$) показал, что у мутантного типа он выше в почти 4 раза чем у дикого типа (111 против 410 ФАР). В то время как максимальная скорость электронного транспорта (ETR_{max}) сопоставимы у обоих. Это показывает, что отличия в ФСА существуют преимущественно в светсобирающем антенном комплексе. Вполне возможно, что нарушаются механизмы передачи энергии между пигмент-белковыми комплексами и РЦ при УФ-мутагенезе, которая приводит к уменьшению эффективного размера свето-собирающего комплекса ФС2, которая и приводит к снижению сигнала БФ и низким показателям квантовых выходов электронного транспорта (φ_{Eo}) и индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}).

Показано, что изменение индукционных кривых БФ и ЗФ является одним из первых быстро регистрируемых параметров клеток водоросли после мутагенеза. Эти параметры могут быть весьма эффективно использованы для диагностики состояния исследуемых объектов. Эти результаты могут быть полезными не только для понимания механизмов регуляции первичных процессов в ФС2 и ФС1, но и для использования различных параметров флуоресценции в биотестировании свойств воды в естественных и искусственных водоемах. Кроме того, полученный пигментный мутант без хлорофилла *б C.reinhardtii* CC-124-y-1 перспективен в оценке загрязненных водных экосистем. Применяемый генетический критерий, пигментный состав, является неоценимым преимуществом для использования данного мутанта в генетическом мониторинге окружающей среды с целью определения мутабильности исследуемой среды. Использование предлагаемого тест-объекта дает интегральную оценку состояния окружающей среды и повышает точность прогноза об отдаленных последствиях мутагенных загрязнений.

Таблица 4. Основные параметры PEA- и PAM-флуориметрии водоросли *C. reinhardtii* у дикого (CC-124) и у мутантного типа (CC-124y-1). Уровень значимости отличий между диким и мутантным типом принят за $p<0,05$(*)

Параметры	CC -124	CC -124y-1	Описание параметра
F_V/F_M	0,728 (100%)	0,365* (50%)	Максимальный квантовый выход первичной фотохимии.
ψ_0	0,485 (100%)	0,601* (124%)	Вероятность транспорта электронов за пределы Q_A^-, то есть эффективность, с которой экситон, захваченный РЦ, движет электрон по цепочке после Q_A.
φ_{Eo}	0,353 (100%)	0,219* (62%)	Квантовая эффективность переноса электронов от Q_A^-
φ_{Do}	0,272 (100%)	0,635* (234%)	Эффективность рассеивания энергии в тепло.
δ_{Ro}	0,47 (100%)	0,688* (146%)	Вероятность, с которой электрон от переносчиков между двумя фотосистемами редуцирует крайние акцепторы электрона на акцепторной стороне ФС1.
ABS/RC	1,485 (100%)	2,865* (193%)	Поток энергии, поглощаемый одним активным РЦ
PI_{ABS}	1,695 (100%)	0,302* (18%)	Индекс производительности - показатель функциональной активности ФС2, отнесённый к поглощаемой энергии.

PI_{total}	1,505 (100%)	0,666* (44%)	Суммарный индекс производительности - показатель функциональной активности ФС 2, ФС1 и цепи переноса электронов между ними.
qE	0,177 (100%)	0,343* (194%)	Способность к pH-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции.
Yield при 25 ФАР	0,598 (100%)	0,319* (53%)	Квантовый выход на свету. ФАР – фотосинтетически активная радиация.
Yield при 600 ФАР	0,132 (100%)	**0,202* (153%)**	
NPQ при 25 ФАР	0,087 (100%)	0,054* (62%)	Нефотохимическое тушение при определенной интенсивности света
NPQ при 600 ФАР	0,156 (100%)	**0,263* (169%)**	
ETR_{max}	27,5 (100%)	**35,6* (139%)**	Максимальная скорость нециклического электронного транспорта
α	0,248 (100%)	**0,087* (35%)**	Коэффициент утилизации световой энергии
$E_н$	111 (100%)	**410* (370%)**	Насыщающая интенсивность света (мкмоль квантов·$м^{-2}$·$с^{-1}$)

Пример изучение генетической токсичности различных вод с использованием полученных мутантов.

Для выявления генетической токсичности стоков автомойки г. Алматы и сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего заводами использовалась мутантный штамм микроводоросли *C. reinhardtii* СС-124у-1 из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры биотехнологии КазНУ им. аль–Фараби.

Для выявления веществ, обладающих генетической токсичности, клетки пигментного мутанта *C. reinhardtii* 124у-1 выдерживали в тестируемой воде, затем рассматривали частоту возникновения обратных мутаций (рассчитывали количество ревертантов) (табл. 5). Ревертант — мутант, у которого в результате обратной, супрессорной или компенсаторной мутации полностью или частично восстанавливаются признаки исходного (дикого) организма.

Для расчета нами использовалась методы макроколоний. Метод макроколоний – обычный микробиологический метод, заключающийся в том, что для учета выживаемости и количества мутаций на поверхность питательной среды в чашки Петри высевается определенное количество клеток из расчета 500-1000 клеток на чашку. Посеянный на чашки материал выставляли в люминостат. Через 7-10 суток под бинокулярной лупой МБС-2 при увеличении 7х2 проводили определение количества выживших колоний хламидомонада и учитывали долю мутантных клонов по цвету колоний. При выращивании водорослей на минеральной среде на свету, наблюдали появление мутационных изменений, связанных с изменением цвета колонии (Квитко и др., 1966). В сточных водах автотранспортных моек г. Алматы не выявились ревертанты пигментного мутанта *C. reinhardtii* 124у-1, контроль равен $<10^{-5}$, а в эксперименте число ревертантов в обеих пробах №1 и №2 также сохранилось ($<10^{-5}$). Это показывает, что пробы проявляют среднюю степень токсичности мутагенной активности в отношении штамма *C. reinhardtii* 124у-1, что подтверждается отсутствием обратных мутаций (табл. 5). В пробах сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода появились ревертанты по изменению цвета, контроль равен $<10^{-5}$, тогда как в

эксперименте в пробе №1 обнаружено 8 колоны ($0,8x10^{-4}$), а в пробе №2 63 колоны ($6,3x10^{-4}$) ревертантов. Это показывает мутагенную активность проб сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода, так как они индуцировали появление обратных мутаций штамма *C. reinhardtii* 124у-1 (табл. 5).

Таблица 5. Изучение генетической токсичности смывных вод автотранспортных моек города Алматы и сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода

	Частота встречаемости	Контроль	Эксперимент (№ пробы)	
			1	2
Сточные воды автотранспортных моек города Алматы	Пигментные мутанты	$< 6,5\times10^{-4}$	$< 6,5\times10^{-4}$	$< 6,5\times10^{-4}$
	Ревертанты по изменению цвета	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$
Сточные воды Павлодарского нефтеперерабатывающего завода	Пигментные мутанты	$< 6,5\times10^{-4}$	$9,1\times10^{-4}$	$2,6\times10^{-3}$
	Ревертанты по изменению цвета	$<10^{-5}$	$0,8\times10^{-4}$	$6,3\times10^{-4}$

Таким образом, на основе пигментного мутанта без хлорофилла *б C. reinhardtii* 124у-1 проведена оценка экологического состояния воды смывных вод автотранспортных моек г. Алматы и сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода

На наш взгляд, система оценки качества воды на основе водорослей является перспективной и может быть в дальнейшем усовершенствована за счет

разработки новых методов тестирования, а также расширения спектра используемых мутантов, например, штаммов: без хлорофилла *б*, без оболочных, светочувствительных, с нарушениями в системе реперации клетки (Садвакасова и др. 2016; Маторин и др., 2016; Zayadan et al., 2014).

3.4. Сезонная динамика параметров флуоресценции хлорофилла фитопланктона Москвы-реки. Оценка устойчивости природного фитопланктона к ионам ртути

При подготовке данного раздела были использованы материалы ранее опубликованных собственных статей в соавторстве (Мошарова и др., 2015).

Краткая характеристика экологического состояния районов исследования. Исторически, по течению р. Москвы в черте города выделяется три участка с различной степенью загрязнения. Первый участок расположен на входе реки в город в районе Тушино, он традиционно считается наиболее чистым. Второй участок реки находится в центральной части города (в пределах Садового кольца), качество воды здесь по нефтепродуктам и металлам колеблется как в течение года, так и вдоль течения реки. Третий участок расположен на выходе реки из г. Москвы, здесь находятся Курьяновские очистные сооружения (КОС), сбросы воды из них приводят к увеличению в реке концентрации биогенных элементов (аммония, нитритов, фосфатов) (Попова, 1972). По данным Доклада Мосэкомониторинга за 2010 г., качество воды в реки Москва на входе в город соответствовало нормативам, установленным для водных объектов культурно-бытового назначения и речные воды на этом участке характеризовались как «условно чистые». В центральной части города в 2010 г и в 2017 г. наблюдалось увеличение содержания взвешенных веществ, аммония и нефтепродуктов по сравнению с содержанием этих веществ на входе реки в город. На выходе из города, под влиянием сброса вод из КОС, в р. Москве значительно увеличиваются концентрации биогенных веществ (в 2010 г. содержание аммония увеличивалось в среднем в 7.7 раз, нитритов в 3 раза, нитратов в 5 раз, фосфатов – в 4 раза). Как следствие, вода в реке Москва на выходе из города характеризовалась в 2010 г. и в 2017 г. как «слабо загрязненная» (Доклады о состоянии окружающей среды в городе Москве 2010 год; Доклады о состоянии окружающей среды в городе Москва 2017 год).

Существенно изменялась температура воды на этих станциях в течение исследованных периодов. Ледяной покров на реке на ст. Тушино в период наших

исследований образовывался в середине ноября 2009 г. Толщина льда при этом варьировала в течение зимы от 2 до 40 см, а сохранялся он до марта 2010 г. Температура воды под льдом была менее 1°С и изменялась в пределах 0,0-0,4°С. В период отсутствия ледового покрова, с апреля по октябрь, температура воды в поверхностном слое реки варьировала от 6 до 30°С.

В центре города на ст. Воробьевы Горы лед на реке появлялся лишь периодически при сильных заморозках и на короткое время. Вовремя наших наблюдений сплошной ледяной покров толщиной около 2 см был замечен лишь в декабре 2010 г. Температура поверхностного слоя воды во время гидрологической зимы (с ноября по март) варьировала от 0,4 до 2°С. Диапазон ее колебаний с апреля по октябрь составил от 5 до 28°С.

На выходе реки из города (ст. Дзержинский) температура воды в период гидрологической зимы (с ноября 2009 г по март 2010 г.) варьировала от 0.5 до 3.5°С, то есть была несколько выше, чем на ст. Воробьевы Горы и значительно выше, чем на ст. Тушино. Весенний подъем температуры поверхностного слоя воды в реке на ст. Дзержинский начинался уже в начале марта, в то время как повышение температуры воды на ст. Тушино и Воробьевы Горы начиналось спустя месяц, в первых числах апреля. Таким образом, на ст. Дзержинский в 2010 г. были отмечены как более высокая температура воды в зимний период, так и более ранний ее весенний подъем.

Проведены комплексные исследования годовой динамики содержания хлорофилла *a* и максимального квантового выхода флуоресценции хлорофилла фитопланктона Москвы-реки в поверхностном слое на трех участках реки. Для оценки влияния мегаполиса и для оценки информативности выбранных биофизических параметров.

В интактных адаптированных к темноте пробах воды регистрировали постоянную (F_o) и максимальную флуоресценцию хлорофилла (F_m), а также относительный выход переменной флуоресценции фитопланктона (F_v/F_m), которая является мерой максимальной квантовой эффективности ФС2. Она отражает эффективность первичных процессов фотосинтеза (F_v/F_m) и представляет собой

безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма.

Регистрация индукционных кривых БФ (на приборе AquaPen AP 100) и световых кривых (на приборе Water-PAM) были проведены с 2016 года по 2017 года. Измерения проводились по 3 трем выше описанным станциям реки Москва, пробы воды (по 2 л с каждой станции) отбирались раз в месяц в течении вегетационного периода фитопланктона начиная с марта по октябрь-ноябрь (2016-2017).

Оценка содержание хлорофилла а. Содержание хлорофилла определяли спектрофотометрическим способом на приборе USB2000, А также коррелированием сигнала флуоресценции (F_O) с содержанием хлорофилла *а* в воде, корреляцию сигнала F_O с содержанием проводили раз месяц с момента цветения до конца вегетационного периода. В зимний период корреляция не проводилась, так как содержание хлорофилла была близка к нулю.

Содержание хлорофилла *а* на ст. Тушино варьировало в период наблюдений от минимального значения 0.26 мкг/л в январе до максимального 24.86 мкг/л в июне 2010 г. (рис. 25). Среднее за весь срок работ на этой станции содержание хлорофилла *а* составило 6,18±7,12 мкг/л. С октября по январь 2009 г. наблюдалось десятикратное падение содержания хлорофилла на ст. Тушино - с 2,73 до 0,26 мкг/л. Заметное возрастание этого показателя начиналось только весной, в апреле, сразу после таяния ледяного покрова и прогрева воды до 6 ºС. Своего максимума содержание хлорофилла *а* достигало в июне – 24.86 мкг/л, затем наблюдалось постепенное снижение его концентраций - до 7,19 мкг/л в сентябре. В первой декаде октября 2010 г. на ст. Тушино был отмечен второй, но более низкий по сравнению с летним, пик концентраций хлорофилла *а* – 14,93 мкг/л (рис. 25А). Однако уже в ноябре 2010 г., после начала образования ледового покрова и снижения температуры воды до значений менее 1 ºС, содержание хлорофилла *а* в воде ст. Тушино снова резко уменьшалось - до 3,36 мкг/л, а

месяцем позднее, в декабре 2010 г., под слоем льда толщиной 20 см и при температуре воды 0,2°С - до 1,36 мкг/л. Интересно отметить, что годом ранее, в октябре 2009 г., второй пик концентраций хлорофилла *a* в водах ст. Тушино не был заметно выражен, а его количество в воде было намного ниже, чем в октябре 2010 г.

В водах реки на ст. Воробьевы Горы содержание хлорофилла *a* варьировало за время проведения исследований от 0,09 мкг/л в январе до 16,77 мкг/л в июле (рис. 25Б). В результате, среднее за весь срок наблюдений содержание хлорофилла *a* для этой станции составило 3,95±5,32 мкг/л, т.е. оказалось почти в 2 раза ниже, чем в водах ст. Тушино. Весеннее увеличение содержания хлорофилла *a* на ст. Воробьевы Горы начиналось, также как и на ст. Тушино, в апреле. Однако резкий подъем содержания хлорофилла *a* в воде этой станции начинался только в июне, а не в мае, как в Тушино. Своего максимального значения этот показатель здесь достигал лишь к концу июля, а не в июне как в Тушино. Период высоких значений концентраций хлорофилла *a* (от 8,95 до 16,77, при среднем 12,43±3,98 мкг/л) продолжался с июня по август. С августа по декабрь наблюдалось последовательное снижение содержания хлорофилла *a* в этом районе реки и в декабре оно составило 0,57 мкг/л. Период низких значений хлорофилла *a* (от 0,09 до 0,17 при среднем значении 0,15±0,05 мкг/л) продолжался с декабря 2009 по март 2010 гг. Судя по содержанию хлорофилла *a* в воде за весь период наблюдений, можно предположить, что фитопланктон на ст. Воробьевы Горы был малочисленнее, чем фитопланктон в Тушино. Кроме того, второй пик обилия фитопланктона, обнаруженный на входе реки в город (ст. Тушино) в октябре 2010 г., на ст. Воробьевы Горы вообще отсутствовал.

Содержание хлорофилла *a* в водах реки Москвы на выходе из города (ст. Дзержинский) варьировало в период наших наблюдений от 0,24 мкг/л в январе до 16,3 мкг/л - в июле 2010 г. В среднем за год содержание хлорофилла *a* составило для этой станции 4,61±5,86 мкг/л. В период с октября 2009 г. по январь 2010 г.

этот показатель на ст. Дзержинский снижался с 0,59 до 0,24 мкг/л, однако в октябре и декабре значения концентраций хлорофилла *a* в воде этой станции были

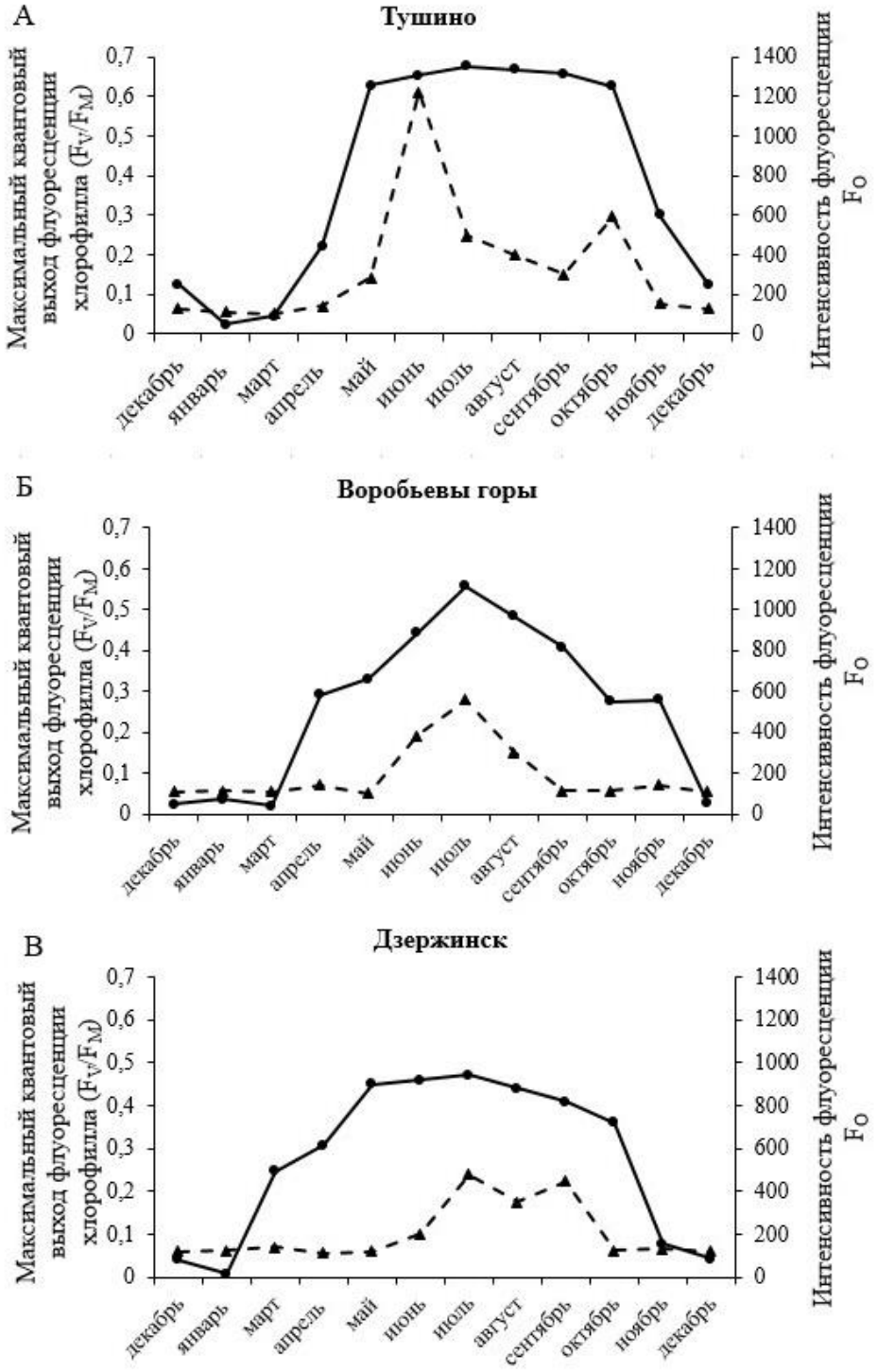

Рис. 25. Динамика параметра максимального квантового выхода (F_V/F_M) (сплошная линия) и минимального уровня флуоресценции (F_O) (штриховая линия) в поверхностном слое воды Москвы-реки: А – на станции Тушино; Б – на станции Воробьевы горы; В – на станции Дзержинский.

практически одинаковы. Весеннее увеличение содержания хлорофилла *a* в водах ст. Дзержинский начиналось в марте (рис. 25В), а не в апреле как в Тушино и на Воробьевых Горах. Период высоких значений хлорофилла *a* (7,65 – 16,30 мкг/л, при среднем 13,01±3,78 мкг/л) продолжался с июня по сентябрь и был на месяц длиннее, чем в Тушино и на Воробьевых Горах. Выраженного осеннего пика содержания хлорофилла *a* на выходе реки из города не наблюдалось. При снижении температуры воды с 16 ºС в сентябре 2010 г до 11ºС в октябре того же года, содержание хлорофилла *a* в воде резко снижалось - с 14,85 до 2.13 мкг/л. Снижение этого показателя продолжалось вплоть до конца наблюдений в 2010 г., когда он достиг 0.62 мкг/мл.

Таким образом, для поверхностных вод реки Москвы на ст. Дзержинский было характерно более раннее начало весеннего развития фитопланктона – на месяц раньше, чем в Тушино и на Воробьевых Горах, и наиболее продолжительный период его летнего обилия - с июня по сентябрь.

Оценка активности природного фитопланктона на основании параметров флуоресценции хлорофилла a. Для оценки потенциальной фотосинтетической активности фитопланктона использовали величину относительной переменной флуоресценции F_V/F_M, отражающей максимальный квантовый выход ФС2 (Маторин, Рубин, 2012). В природных водоемах, богатых элементами минерального питания, значения F_V/F_M могут достигать 0,6-0,7. Под действием стрессовых факторов, в том числе и загрязняющих веществ, этот показатель может уменьшаться, у мертвых клеток он равен 0.

В динамике фотосинтетической активности фитопланктона, выраженной через величину соотношения F_V/F_M, также, как и в случае хлорофилла, *a,* прослеживается влияние сезонного фактора (рис. 25 А-В). В зимний период активность фитопланктона на всех трех станциях была крайне низка (F_V/F_M менее 0.01). Крайне низкие значения соотношения F_V/F_M в этот период были связаны, вероятно, с интенсивным охлаждением поверхностных вод и сопутствующей

сменой осеннего комплекса фитопланктона на зимний. Четко выраженные минимумы значений F_V/F_M наблюдались только в Тушино и Дзержинском в январе, тогда как для ст. Воробьевы горы низкий уровень этого показателя был отмечен в период с декабря 2009 г. по март 2010 г.

В весенний период (с марта по апрель) наблюдалось резкое увеличение активности фитопланктона, скорее всего, это было связано с сезонным подъемом температуры воды. Уже в марте на ст. Дзержинский она составила 3,5^{o}C и, соответственно, величина соотношения F_V/F_M для пробы воды с этой станции достигла 0,25, тогда как в Тушино и на Воробьевых Горах значения F_V/F_M в марте составили только 0,04 и 0,02 при температурах воды 0,3 и 0,4^{o}C соответственно. В мае значения F_V/F_M в пробах воды с обследованных станций колебались уже в пределах 0,33 – 0,63, причем максимальное значение F_V/F_M, а следовательно - и активности фитопланктона, было обнаружено на станции в Тушино.

Важно отметить, что подъем концентрации фитопланктона по хлорофиллу несколько запаздывает по сравнению с F_V/F_M. Этот факт показывает, что появление в популяции клеток водорослей с высокой активностью фотосинтетического аппарата и, соответственно, с высоким значением F_V/F_M предшествует наступлению периода цветения, сопровождающегося увеличением концентрации фитопланктона. Подобный эффект наблюдался и на озере Байкал (Маторин, Рубин, 2012).

В летний период показатель F_V/F_M достигал на всех станциях наиболее высоких значений, причем в Тушино это имело место в июне (F_V/F_M = 0,68), а на Воробьевых Горах и в Дзержинском – в июле (0,56 и 0,47 соответственно). Относительно высокая для речного фитопланктона фотосинтетическая активность, зарегистрированная в летний период на всех обследованных станциях, свидетельствует о том, что фитопланктон летом не был лимитирован по основным факторам среды и сумел адаптироваться к ее относительно высоким (до 30^{o}C) температурам воды. После летних максимумов фотосинтетическая активность фитопланктона на всех трех станциях снижалась, причем этот спад был более всего выражен на ст. Воробьевы Горы, а менее всего – в Тушино.

Интересно, что максимальная величина F_V/F_M, обнаруженная в летних пробах воды, оказалась наиболее низкой в Дзержинском (0,47), что может свидетельствовать о негативном влиянии на потенциальную активность фотосинтеза фитопланктона в реке загрязнений, поступающих в нее из мегаполиса, также как и сбросов КОС. В то же время наиболее высокие F_V/F_M, наблюдавшиеся в летний период в Тушино, вероятно, свидетельствуют о том, что условия для развития фитопланктонного сообщества здесь были наиболее благоприятными в летний период по сравнению с двумя другими станциями.

Таким образом, на трех стациях сезонный ход фотосинтетической активности фитопланктона и концентрации хлорофилла отличались (рис. 25). На станции Тушино фитопланктон характеризовался высокой активностью РЦ (F_V/F_M) с мая по октябрь включительно при наличии двух пиков биомассы (F_O). На станции Воробьевы горы пик активности и биомассы фитопланктона приходился на июль. На станции Дзержинский увеличение фотосинтетической активности началось на месяц раньше, чем на других станциях, наибольшие значения F_V/F_M выявлены в мае-октябре, а наибольшие значения биомассы - в июле – сентябре. На всех участках реки в весенний период увеличение фотосинтетической активности фитопланктона начиналось раньше увеличения биомассы водорослей.

В летний период самые высокие фотосинтетическая активность и биомасса фитопланктона отмечена на условно чистом участке реки (станция Тушино).

Исследование активности фитопланктона с помощью световых и индукционных кривых флуоресценции хлорофилла. Индукционные и световые кривые флуоресценции измеряли с 2016 по 2017 года в течении года. Для отбора проб были выбраны 3 станции по пути русла Москвы-реки, вход в город Москву, вблизи станции Тушино, середина, вблизи станции Воробьевы горы и выход реки из Москвы вблизи станции Дзержинский. Для оценки состояния водорослей применялся импульсный флуориметр AquaPen FP 100 (PSI, Чехия). Пробы отбирались непосредственно у береговой линии реки. Регистрация

флуоресценции хлорофилла проводилось в количестве не менее чем 10-ти повторностей. Полученные исходные данные были анализированы с помощью стандартной процедуры анализа индукционных кривых БФ JIP-теста (Strasser et al., 1995; Strasser et al., 2004). Обработка данных индукционных кривых БФ, позволяет быстро оценить состояние ППФ фитопланктона.

Наибольший интерес представляло сравнить параметры флуоресценции хлорофилла во время весеннего цветения и летней депрессии развития фитопланктона. Сравнение параметров квантовых потоков электронов (φ_{Po}, φ_{Eo}, φ_{Ro}, φ_{Do}) в разные месяцы показало, что в весенний период на всех станциях наблюдается в среднем увеличение эффективности переноса электронов на всех стадиях фотосинтетического электронного транспорта и снижение доли диссипации энергии антенными комплексами (φ_{Do}) (рис. 26). Следует отметить, что параметры, связанные с активностью ФС2 (φ_{Po}, φ_{Eo},), были наиболее различимы по месяцам. В весенний период фотосинтетическая активность ФС2 была несколько выше чем в летний период, тогда как изменения квантового выхода восстановления крайних акцепторов ФС1 (φ_{Ro}) были статистически незначимы. Вполне возможно, что снижение активности ФС2 опосредовано ухудшением минерального питания, так как известно, что активность ФС2 на прямую зависит от способности клеток водорослей восстанавливать D1 белок ФС2. Тогда как белки ФС1 наименее подвержены фотодеструкции или другим неблагоприятным воздействиям.

Параметр вероятности переноса электрона далее первичного хинонного акцептора Q_A (ψ_o), изменяется незначительно на всех трех станциях Москвы реки (май и июль). В свою очередь можно заключить, что в исследуемой воде нет влияния на сайт связывания Q_B переносчиков электрона. Связанный с предыдущим параметром квантовый выход электронного транспорта (φ_{Eo}) ФС2 снижается, главным образом счет снижения параметра F_V/F_M в летнее время.

Известно, что параметр F_V/F_M тесно связан с эффективностью антенного комплекса, изменение сопряженности антенного комплекса и РЦ Р680 снижает общий квантовый выход первичного процесса разделения зарядов на РЦ Р680 и

увеличивает соотношение антенного комплекса к «активным» – открытым РЦ ФС2. Если рассмотреть отношения потоков энергии отнесённых к активным реакционным центрам, то мы наблюдаем, что параметр ABS/RC увеличивается, которое показывает уменьшение общего количества «активных» РЦ ФС2. Снижение количества активных реакционных центров ведет к возрастанию доли тушения энергии возбуждения в антенном комплексе за счет диссипации в тепло (DI_O/RC).

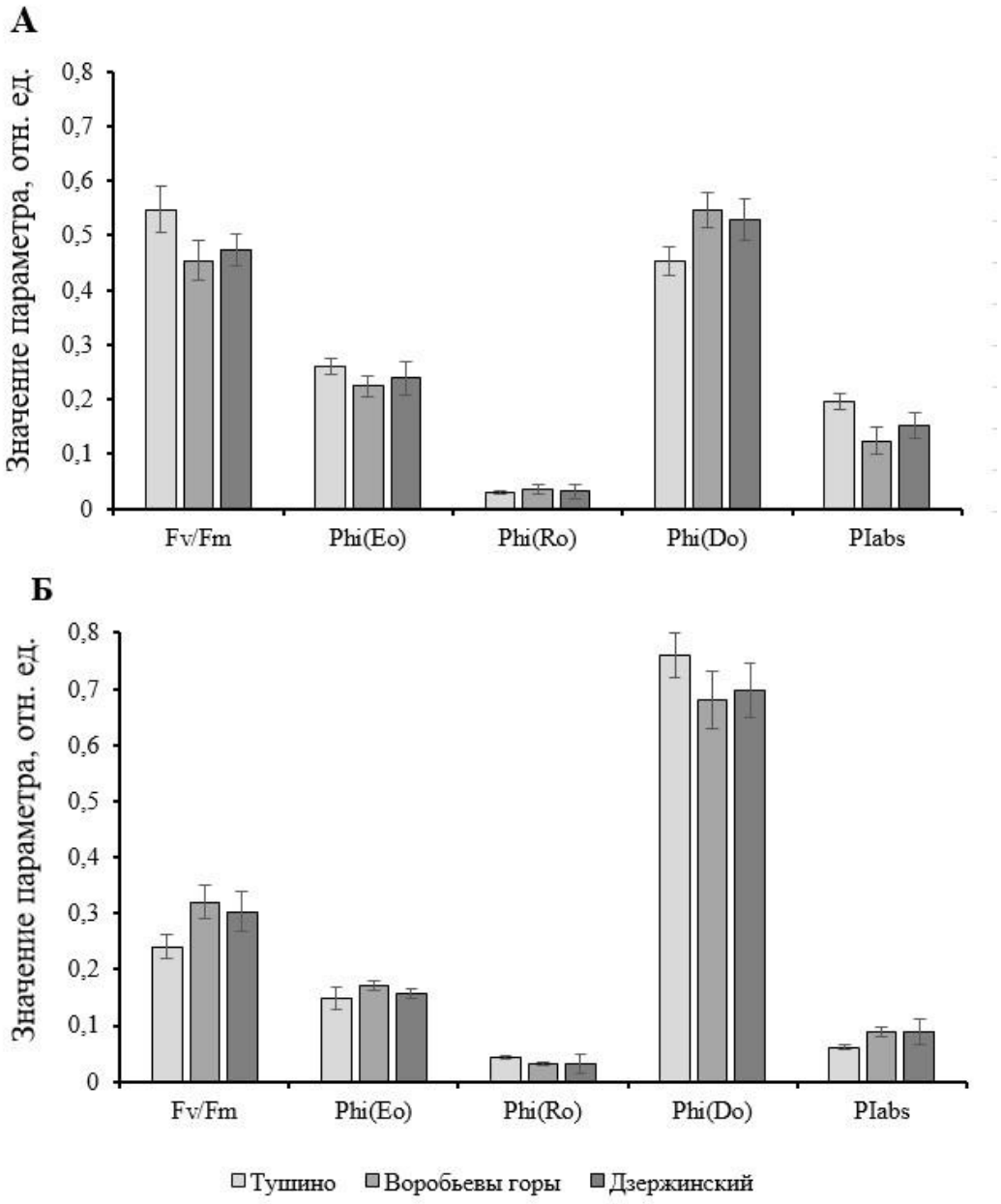

Рис. 26. Изменение параметров JIP-теста флуоресценции хлорофилла весенний (май) и летний (июль) период 2017. Планки погрешностей соответствуют доверительному интервалу (α=0,05, n=10).

«Витальность» растений можно охарактеризовать индексом производительности PI_{ABS} (Strasser et al., 2000). Этот интегральный параметр включает себя три независимых параметра: плотность «активных» РЦ; эффективность движения электрона от захваченного экситона по электрон транспортной цепи далее акцептора Q_A; и вероятность того что поглощённый фотон будет захвачен РЦ. Индекс производительности (PI_{ABS}) отражает функциональное состояние ФС2 и даёт нам численную характеристику текущего состояния ФСА (Strasser, 2004). Весной (май) наблюдаем хорошие показатели индекса производительности (PI_{ABS}) на всех станциях Москвы реки. На ст. Тушино показатель индекса производительности был несколько выше чем на ст. Воробьевы горы и у ст. Дзержинский, тогда как в летнее время мы четко видим снижение индекса производительности ФС2 на всех станциях.

Тем самым, детальные исследования выявили, что эффективность световых реакций фотосинтеза в ФС2 выше весной по сравнению с летом. Так у весеннего фитопланктона максимальный квантовый выход (F_V/F_M), квантовый выход электронного транспорта ФС2 (φ_{Eo}) и индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}), максимальная скорость нециклического электронного транспорта (ETR) были выше, а эффективность нефотохимического тушения (NPQ) и показатель нерегулируемого нефотохимического тушения в антенном комплексе (φ_{Do}) были ниже таковых у летнего фитопланктона.

Световые кривые. Протокол световых кривых реализованный на импульсном флуориметре Water-PAM позволяет оценить реакцию фитопланктона на возрастающую световую нагрузку. Существует 3 непосредственно получаемых от прибора основных параметра: Yield или квантовый выход на свету, и рассчитываемый с квантового выхода скорость нециклического электронного транспорта (ETR) по ЭТЦ и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ).

Квантовый выход флуоресценции на свету является параметром, который отражает долю энергии, которая уходит на фотохимические превращения ($Y=(F_m'-F_o)/F_m'$). На свету этот параметр снижается в связи с восстановлением

пула пластохинонов и запуска механизмов нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла *a* ССК2. Первая точка в световой кривой является максимальным квантовым выходом (F_V/F_M) после темновой адаптации, далее значение параметра снижается под воздействием световой нагрузки. На рисунке 27 представлены световые кривые по двум месяцам (июнь и сентябрь). Квантовый выход на свету (Yield) ст. Воробьевы горы и ст. Дзержинский в июне имеют более низкие значения чем сентябре. Отмечено, что относительно высокие значения среди других станций квантового выхода на свету у ст. Тушино в июне. В сентябре отличия между станция не столь значительные, в тоже время у станции Тушино кривая квантового выход на свету является наиболее высокой, а у станции Дзержинский снижена.

Световые кривые нециклического транспорта электронов (ETR) отражают относительное количество электронов, пропускаемых через две фотосистемы при разных интенсивностях действующего света. При анализе кривых ETR используются два основных характеристики тангенс угла наклона кривой ETR (α) на свето-лимитированном участке и максимальная скорость нециклического транспорта электронов по ЭТЦ (ETR_{max}). Считается, что параметр α может характеризовать относительное эффективное сечение свето-собирающей антенны. Наибольший размер свето-собирающей антенны в июне наблюдали у фитопланктона станции Тушино, у станций Дзержинский и Воробьевы горы размер эффективного сечения свето-собирающей антенны сильно уменьшен. Отмечено, что в сентябре параметр α значительно повышался у всех станций. Максимальные скорости нециклического транспорта электронов по всем станциям отличались. Фитопланктон станции Тушино имел наибольшее значение ETR_{max} в июне и в сентябре, тогда как у станций Воробьевы горы и Дзержинский был несколько снижен. В июне у станции Дзержинский наблюдали очень низкие значения ETR_{max}.

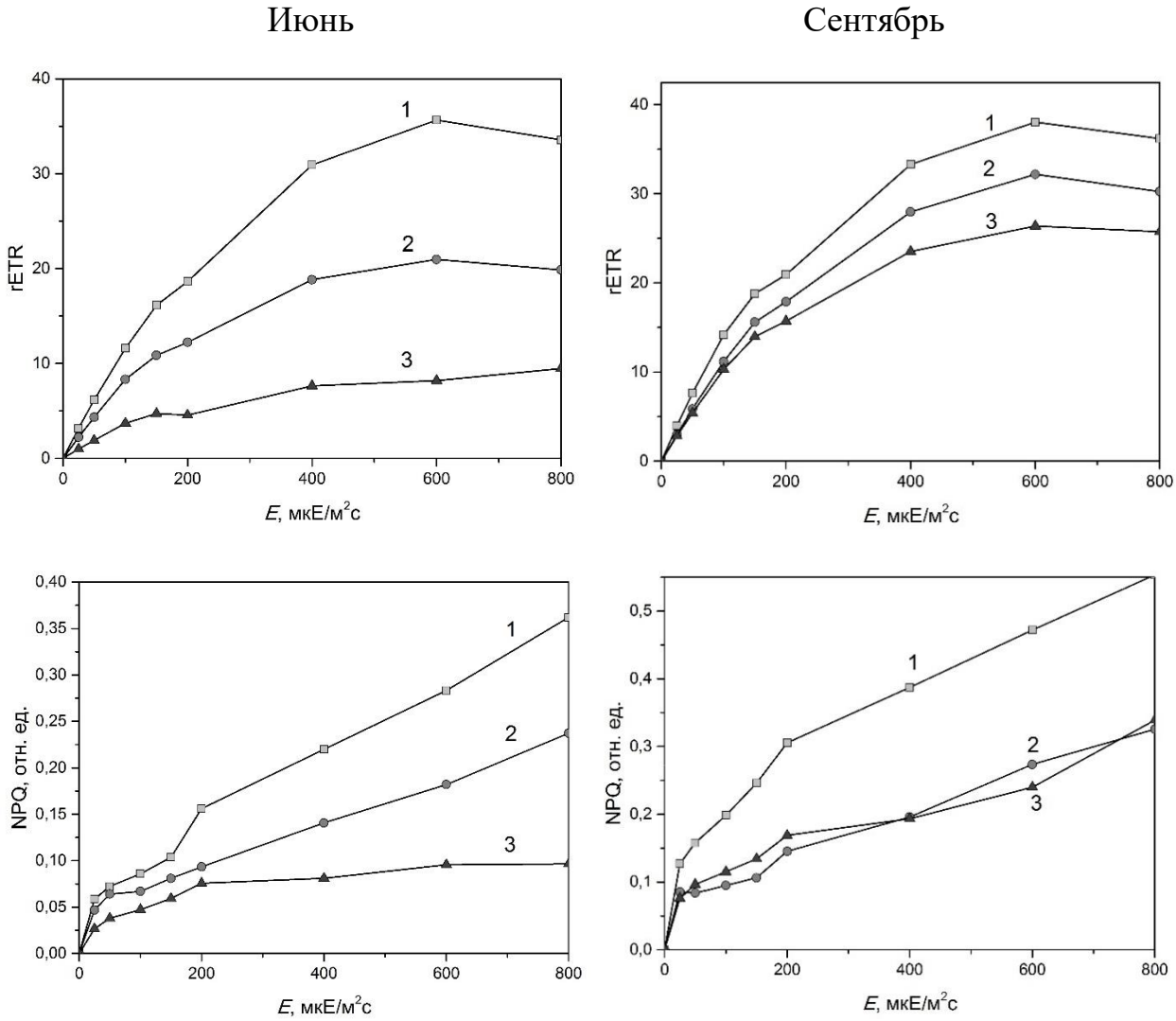

Рис. 27. Параметры флуоресценции в зависимости от интенсивности действующего света фитопланктона по станциям реки Москва. Станция Тушино – 1; станция Воробьевы горы – 2; станция Дзержинский – 3. Данные приведены по июню и сентябрю 2016 года.

Образование нефотохимического тушения (NPQ) на свету отражает способность водорослей эффективно тушить возбужденные состояния хлорофилла преимущественно тепловой диссипацией или иными путями. Как правило у «неголодающих» водорослей механизмы защиты от избыточной инсоляции развиты хорошо и при возрастании световой нагрузки параметр NPQ сопоставимо растет с интенсивностью света. На станции Тушино NPQ по двум месяцам показаны высокие значения этого параметра, что свидетельствует о

хороших механизмах защиты от инсоляции. Тогда как, у станций Воробьевы горы и Дзержинский наблюдаем более низкие значения чем у станции Тушино, что показывает худшие показатели способности водорослей адаптироваться к высокой инсоляции привычной для открытых и хорошо освещаемых речных вод.

Определение устойчивости фитопланктона к его к ионам ртути в зависимости от сезона

Известно, что природный фитопланктон в зависимости от сезона и условий меняет свой видовую и пространственную структуру в течении вегетационного периода. Следовательно, меняется и устойчивость фитопланктонного сообщества Москвы-реки к ионам ртути в зависимости от сезона.

В середине мая в водах Москвы-реки на всех трех участках наблюдали комплекс весеннего цветения фитопланктона. Обнаружено, выраженное отличие между тремя станциями Москвы-реки после добавление в пробы ионов ртути по двум основным параметрам JIP-теста (рис. 28). Ионы ртути значимо снижали квантовый выход уже при концентрации 1 мкМ, а уже при 4,6-24 мкМ вызывали снижение F_V/F_M на 50% после 3 часов инкубации. Стоит отметить, что квантовый выход слабее снижается у фитопланктона со ст. Тушино и ст. Воробьевы горы, тогда как фитопланктон со ст. Дзержинский обладал слабой относительной устойчивости к ионом ртути. Индекс производительности ФС2 является комбинированным параметром флуоресценции хлорофилла. Значимое снижение данного параметра мы наблюдали уже при концентрации ионов ртути 0,1 мкМ, что вполне сопоставимо с порогом чувствительности культуры водорослей, выращенных лабораторных условиях. Снижение индекса производительности на 50% наблюли в пределах концентрации ртути 0,1-0,9 мкМ. Различия в устойчивости к токсиканту между станциями фитопланктона увеличилась, как и в случае с квантовым выходом в слабо загрязненном участке ст. Дзержинский параметры флуоресценции (F_V/F_M и PI_{ABS}) сильнее ингибировались нежели на ст. Тушино, тогда как фитопланктон ст. Воробьевы горы показывал средние

показатели устойчивости к токсиканту. Тем самым различия между пробами воды взятыми на разных станциях стали более очевидными при использовании индекса производительности PI_{ABS}.

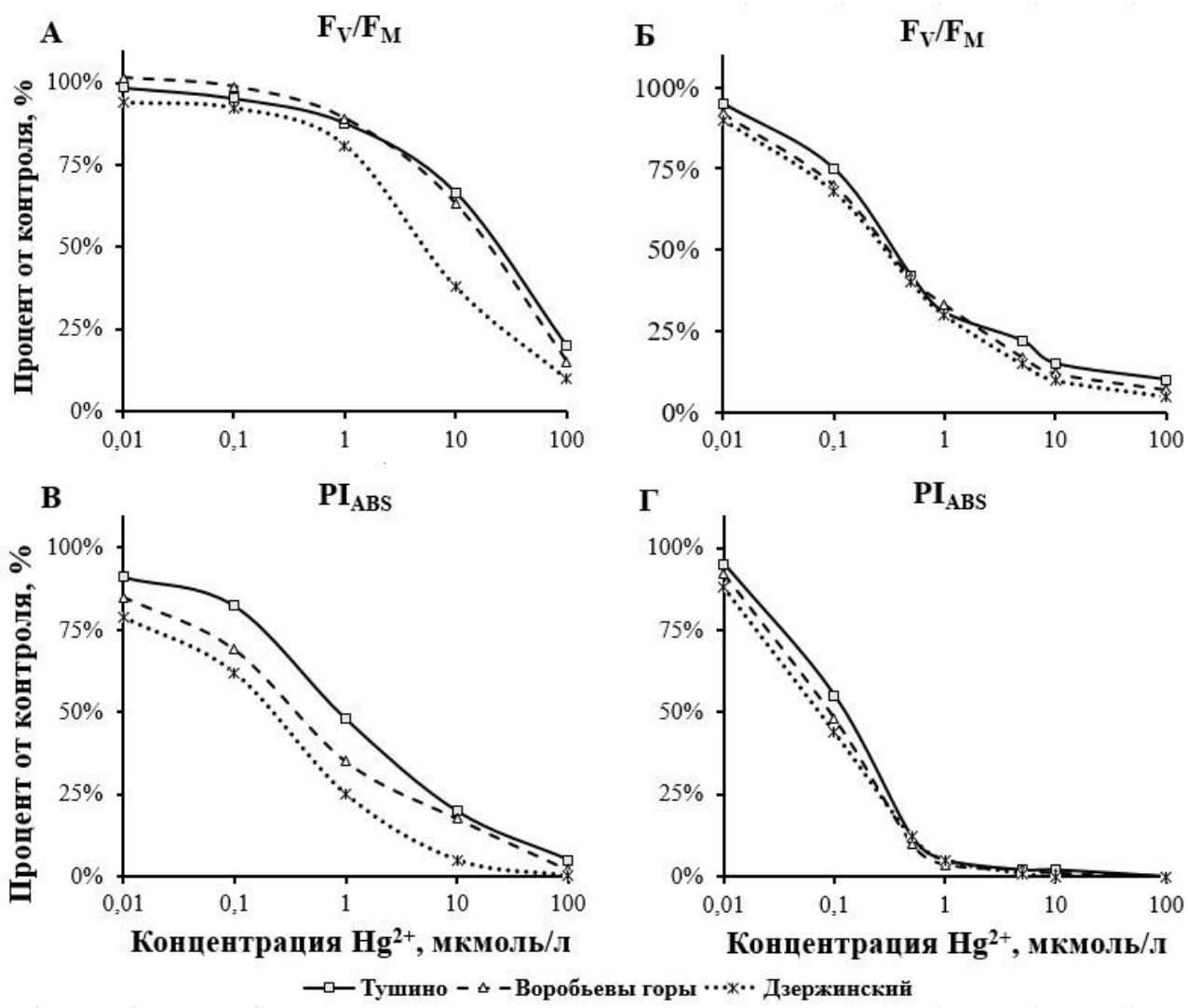

Рис. 28. Максимальный квантовый выход флуоресценции (F_V/F_M) (А, Б) и индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) (В, Г) фитопланктона Москвы-реки в весеннее (А, В) и летнее (Б, Г) время после 3 часов инкубации в присутствии ионов ртути. Кривые представлены в виде снижения флуоресцентных параметров (F_V/F_M, PI_{ABS}) относительно контроля в процентах. Станции отбора проб для исследования: Тушино (сплошная линия), Воробьевы горы (штриховая линия) и Дзержинский (пунктирная линия).

В летнее время (июль) наблюдался спад фотосинтетической активности и биомассы водорослей (снижение кантового выхода до 0,4-0,5, напротив 0,7 в мае).

Это в свою очередь оказало влияние на устойчивость фитопланктона к ионам ртути (рис. 28). Квантовый выход существенно снижался уже при концентрации 0,1 мкМ токсиканта. Снижение параметра (F_V/F_M) на 50% наблюдалась при концентрации ртути 0,15-0,28 мкМ, что сопоставимо с чувствительностью индекса производительности в весеннее время. На 50% снижение индекса производительности оказывали 0.06-0.09 мкМ ионов ртути, что более чем в 2 раза выше квантового выхода.

Отмечено, что различия между станциями были мало значительны, при воздействии долгого голодания или же смены структуры фитопланктона фотосинтетическая активность значительно снижается и вполне возможно, что у ослабленного фитопланктона Москвы-реки в значительной мере повышалась чувствительность к ионам ртути. В тоже время отсутствовали различия в чувствительности фитопланктона между станциями реки в летнее время при инкубации с ионами ртути.

Оценка параметров флуоресценции F_V/F_M и PI_{ABS} природного фитопланктона при воздействии ионов ртути показала, что индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) является более чувствительным параметром, чем максимальный квантовый выход флуоресценции (рис. 28). Отличия PI_{ABS} от контроля проявлялись при самой низкой испытуемой концентрации токсиканта. Фитопланктона с разных участков реки проявлял разную устойчивость к воздействию ионов ртути только в весенний период. Летом устойчивость фитопланктона была ниже по сравнению с весной без выраженных различий между станциями. Сезонное изменение устойчивости может быть обусловлено изменением видового состава фитопланктона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотосинтез является одним из важнейших биохимических процессов, от которого напрямую зависит состояние всей биосферы. Стремительное развитие промышленности привело к попаданию различных загрязняющих веществ, которые негативно влияют на состояние окружающей среды и отдельных ее компонентов. На этом фоне наиболее актуальными являются задачи по разработке быстрых методов биомониторинга состояния окружающей среды. Одним из быстро развивающихся методов диагностики физиологического состояния фотосинтезирующих организмов является метод регистрации флуоресценции хлорофилла, благодаря которому стало возможно следить за протеканием отдельных фотосинтетических реакций на нативных объектах.

В данной работе с помощью уникального подхода – одновременной регистрации 3-х различных сигналов: быстрой и замедленной флуоресценции, а также отражения света при длине волны 820 нм, удалось выявить последовательность воздействия метилртути и фенола на световые реакции фотосинтеза. Показано, что первичная «мишень» воздействия токсиканта на фотосинтетический аппарат зависит от природы токсиканта и от его концентрации. Первичный сайт воздействии ионов метилртути локализован на акцепторной стороне ФС2. Тогда как фенол снижал преимущественно электрическую компоненту ($\Delta\psi$) электрохимического градиента на мембране тилакоида. Увеличение концентрации и времени воздействия влияло на активность кислород выделяющего комплекса и скорости окисления реакционного центра ФС1.

Апробирование подхода регистрации флуоресцентных параметров на природном фитопланктоне Москвы-реки показало, что фотосинтетическая активность фитопланктона по всему руслу была неодинаковой. Наиболее высокие значения активности фотохимических процессов были обнаружены у фитопланктона на условно чистом участке реки (на входе в город), тогда как на слабо загрязненных участках (середина реки и на выходе из города) активность

была снижена. Эксперименты по инкубации природного фитопланктона в присутствие ртути выявили различия в устойчивости к токсическому воздействию у фитопланктона с разных участков, а также более высокую устойчивость весеннего фитопланктона по сравнению с летним. Наиболее чувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла – индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) и квантовый выход электронного транспорта (φ_{Eo}), которые можно рекомендовать при проведении биотестирования и мониторинга активности световых реакций фотосинтеза фитопланктона в природных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Токсический эффект ионов метилртути на световые реакции зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas moewusii* проявлялся начиная с концентрации 0,1 мкМ. Наблюдалось снижение относительной скорости нециклического электронного транспорта (ETR), и нарушения на акцепторной стороне ФС2 – снижаются квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (φ_{Eo}), индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) и энергизация мембраны тилакоидов ($\Delta\psi$ и ΔpH). При более высоких концентрациях токсиканта нарушения затрагивают кислород-выделяющую систему и акцепторную сторону ФС1. Скорость роста водорослей снижается уже при концентрации 0,1 мкМ ионов метилртути.
2. В присутствии фенола у водоросли *S. quadricauda* снижалась электрическая компонента ($\Delta\psi$) энергизации фотосинтетических мембран, что проявлялось в снижении параметра индукции замедленной флуоресценции при 10-50 мс (I_1/D_2). При более высоких концентрациях фенола нарушения затрагивали акцепторную сторону ФС2 (φ_{Eo}, ψ_O).
3. У водоросли *Chlamydomonas reinhardii* выявлены достоверные различия в параметрах флуоресценции штамма дикого типа СС-124 и мутантного штамма СС-124у-1, у которого отсутствует хлорофилл *б*.
4. Сезонная динамика параметров флуоресценции – максимального квантового выхода (F_V/F_M) и минимальной флуоресценции (F_O) фитопланктона различалась на участках реки Москва, расположенных при входе реки в черту города, в середине города и на выходе из города. Эффективность световых реакций (φ_{Eo}, PI_{ABS}, φ_{Do}) фотосинтеза в ФС2 была выше у весеннего фитопланктона по сравнению с летним.
5. Устойчивость фитопланктона реки Москвы к воздействию ионов ртути была выше в весенний период в сравнении с летим. Наибольшую чувствительность к воздействию ионов ртути на водоросли показал параметр флуоресценции хлорофилла индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫЙ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПХ – пластохинон

ППФ – первичные процессы фотосинтеза

РЦ – реакционный центр

ССК – светособирающий комплекс

ФС – фотосистема

ФАР – фотосинтетически активная радиация

ФСА – фотосинтетический аппарат

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

F_O – интенсивность флуоресценции хлорофилла, при котором все РЦ ФС2 находятся в «открытом» состоянии

F_M – интенсивность флуоресценции хлорофилла, при котором все РЦ ФС2 находятся в «закрытом» состоянии

F_V – величина переменной флуоресценции, равная F_M-F_O

P680 – реакционный центр ФС2

P700 – реакционный центр ФС1

PQ – пул пластохинонов

Q_A – первичный стабильный хинонный акцептор в ФС2

Q_B – вторичный хинонный акцептор в ФС2

Z – вторичный донор электрона в ФС2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антал Т.К. Исследование влияния ионов метилртути и меди на первичные процессы фотосинтеза у зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* с использованием параметров кинетики кривых переменной флуоресценции хлорофилла / Т.К. Антал, Е.Э. Граевская, Д.Н. Маторин, А.А. Волгушева, В.А. Осипов, Т.Е. Кренделева, А.Б. Рубин // Biophys. (Russian Fed.). – 2009. – Т.54 – №4 – С.681–687.
2. Апарцин М.С. К вопросу о механизме действия пирокатехина и п–бензохинона на клетки нителлы / М.С. Апарцин, М.В. Саксонов, Д.И. Стом // Физиология растений. – 1979. – Т.244 – №.2 – С.510–512.
3. Воронова Е.Н. Изменения состояния фотосинтетического аппарата диатомовой водоросли *Thallassiosira weisflogii* при фотоадаптации и фотоповреждении / Е.Н. Воронова, И.В. Конюхов, Ю.В. Казимирко, С.И. Погосян, А.Б. Рубин // Физиология растений. – 2009. – Т.56 – №6 – С.836–843.
4. Гольцев В.Н. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений / В.Н. Гольцев, Х.М. Каладжи, М.А. Кузманова, С.И. Аллахвердиев, – Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014 – 220 с.
5. Грушко Я.М. Вредные органические соединения в промышленных сточных водах, 2 изд. / Я. М. Грушко – Л.: Химия, 1982. – 216 с.
6. Грушко Я.М. Сточные воды сульфат–целлюлозных заводов и их токсичность для гидробионтов / Я.М. Грушко, О.М. Кожова, Д.И. Стом // Гидробиология. – 1975. – Т.11 – №5 – С.118–126.
7. Заядан Б.К. Биомониторинг водных экосистем на основе микроводорослей / Д. Н. Заядан, Б.К. Маторин – Москва: Изд–во “Альтекс,” 2015. – 252 с.
8. Иванова Е.Ю. Степанова Л.И. Накопление генотипических соединений и пероксидазная активность водорослей в Воронежском водохранилище Иркутск: ИГУ, 1995. – С.23–28.

9. Квитко К.В. Некоторые принципы генетико–селекционной работы с микроорганизмами в применении к хлорелле / К. В. Квитко, И. А. Захаров, В. Хропова // Генетика. – 1966. – №2 – 148с.
10. Кожова О.М. Динамика численности фитопланктона в районе г. Байкальска / Г. С. Кожова, О.М. Изместьева, Л.Р. Святенко // Экологические исследования Байкала и байкальского региона – 1992. – №1 – С.119–137.
11. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Корнеев Д.Ю. – К.: Альтерпрес, 2002. – 188с.
12. Костяев В.Я. Действие фенола на водоросли / В. Я. Костяев // Тематический сб. “Влияние фенола на гидробионтов”. – 1973. – С.98–113.
13. Котелевцев С.В. Функциональный отклик мембранных структур клеток животных на воздействие антропогенных факторов окружающей среды / С. В. Котелевцев – 1997.
14. Лейте В. Определение органических загрязнений питьевых, природных и сточных вод / В. Лейте – Москва: Химия, 1975. – 199 с.
15. Лукина Г.А. Детоксицирующая активность хлореллы / Г.А. Лукина // Инф. бюл. ИБВВ. – 1972. – №13 – С.12–15.
16. Маторин Д.Н. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей / Д.Н. Маторин, А.Б. Рубин – Москва: –Ижевск ИКИ–РХД, 2012. – 256 с.
17. Маторин Д.Н. Флуоресценция хлорофилла для биодиагностики растений / Д.Н. Маторин, А.А. Алексеев – Москва: ООО “ПКЦ Альтекс”, 2013. – 364 с.
18. Маторин Д.Н. О возможности использования флуоресценции хлорофилла для оценки токсического действия фенолов на зеленые водоросли / Д.Н. Маторин, С.Н. Горячев, Ф.Ф. Протопопов, М.В. Иванов, В.Ю. Пономарев, П.С. Венедиктов // Естественные и технические науки. –2015 –Т.89. –№11. –С.148-150.
19. Маторин Д.Н. Изучение биофизических характеристик пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с использованием флуориметра М-РЕА-2 / Д.Н. Маторин, Ф.Ф. Протопопов, А.К. Садвакасова, А.А. Алексеев, Л.Б. Братковская, Б.К. Заядан // Биофизика. –2016. –Т.61. –№4. –С. 717-725.

20. Мельников Н.Н. Пестициды и окружающая среда / О.А. Мельников, Н.Н. Волков, А.И. Короткое, – Москва: Химия, 1977. – 240 с.
21. Мошарова И.В. Мониторинг вод реки Москва с помощью микробиологических параметров и флуоресценции хлорофилла *a* / И.В. Мошарова, В.В. Ильинский, Д.Н. Маторин, С.А. Мошаров, А.Ю. Акулова, Ф.Ф. Протопопов // Микробиология. –2015. –Т.84. –№6. –С. 712-724.
22. Мур Д. Тяжелые металлы в природных водах: Контроль и оценка влияния: Пер. с англ / Д. Мур, С. Рамамурти – 1987.
23. Попова Н.М. Санитарное состояние р. Москвы по многолетним гидрохимическим данным (обзор литературы по 1965 г.) – Москва: Издательство литературы по строительству, 1972. – С.23–50.
24. Протопопов Ф.Ф. Влияние метилртути на параметры световой зависимости флуоресценции зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* / Ф.Ф. Протопопов, Д.Н. Маторин, Н.Х. Сейфуллина, Л.Б. Братковская, Б.К. Заядан // Микробиология. –2015. –Т.84. –№6. –С. 725-731.
25. Рубин А.Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза / А.Б. Рубин, Т.Е. Кренделева // Успехи биологической химии, – 2003. – Т.43 – №1 – С.225–266.
26. Рубин А.Б. Биофизика: в 3–х томах. Т.III. Биофизика клеточных процессов. Механизмы первичных фотобиологических процессов. / А.Б. Рубин – Ижевский институт компьютерных исследований, 2013. – 480 с.
27. Садвакасова С.К. Пигментные мутанты зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: изучение их морфологических свойств и состояния фотосинтетического аппарата / Н.Р. Акмуханова, Б.К. Заядан, Д.Н. Маторин, Ф.Ф. Протопопов, А.А. Алексеев, К. Болатхан // Физиология растений. –2016. –Т.63. –№4. –С. 472-480.
28. Сахарнов А.В. Очистка сточных вод и газовых выбросов в лакокрасочной промышленности / А.В. Сахарнов. – Москва: Химия, 1971. – 144 с.
29. Сиренко В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды / В.Н. Сиренко, Л.А. Козицкая. – Киев: Наукова думка, 1988. – 256 с.

30. Смуров А.В. Основы экологической диагностики. Биологические и информационные аспекты / А.В. Смуров. – Москва: Ойкос, 2003. – 188 с.
31. Стом Д. И. Действие фенолов на некоторые виды водорослей / А.М. Стом, Д.И. Бейм // Гидробиол. журн. – 1976. – Т.12 – №6 – С.53–57.
32. Стом Д.И. Фитотоксичность и механизм детоксикации фенолов водными растениями. Автореф. дис. …докт. биол. наук. / Д. И. Стом. – Киев, 1982. – 48 с.
33. Стом Д.И. Некоторые перспективы оценки влияния продуктов техногенеза на экосистему оз. Байкал / Д.И. Стом, В.И. Гурман, Г.Н. Константинов, Н.Ф. Кашина, Е.А. Зилов // Тематический сб. “Геохимия техногенных процессов” – 1990. – С.117–123.
34. Терехова В.А. Биотест–системы для задач экологического контроля: Методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест–культур / В.А. Терехова, Л.П. Воронина, Д.В. Гершкович, В.И. Ипатова, Е.Ф. Исакова, С.В. Котелевцев, Т.О. Попутникова, А.А. Рахлеева, Т.А. Самойлова, О.Ф. Филенко, 2014. – 48 с.
35. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах–энергопреобразующих органеллах растительной клетки / А. Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №4 – С.24–32.
36. Успенская В. Экология и физиология питания пресноводных водорослей: Курс лекций / В. Успенская – 1966.
37. Федтке К.М. Биохимия и физиология действия гербицидов / К.М. Федтке – Москва: Агропромиздат, 1985. – 223 с.
38. Филенко О.Ф. Водная токсикология / Филенко О.Ф. – Москва: Изд–во “Черноголовка”, 1988. – 156 с.
39. Филенко О.Ф. Основы водной токсикологии / О. Ф. Филенко, И. В. Михеева – Москва: Колос, 2007. – 144 с.
40. Флеров Б.А. Экспериментальное исследование фенольного отравления у рыб, 1973. – С.5–38.

41. Харлампович Г.Д. Фенолы / Ю. В. Харлампович, Г.Д. Чуркин, –М.: Химия, 1974. – 376 с.

42. Холл Д.О. Фотосинтез: Пер. с англ. / Д.О. Холл, К.К. Рао. – М.: Мир, 1983. – 134 с.

43. Худяков В.И. Пространственное распределение и состояние планктона озера Байкал в районе действия сточных вод целлюлозо–бумажного комбината: дис. … канд. биол. наук: 03.00.18. / Худяков Валентин Иванович. – М.: 2004. – 276 с.

44. Штирбет А. Моделирование кинетики флуоресценции хлорофилла *a*: связь с фотосинтезом / А. Штирбет, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин // Биохимия. – 2014. – Т.79 – №4 – С.379–412.

45. Юрин В.М. Основы ксенобиологии / В. М. Юрин – Минск: Новое знание, 2002. – 267 с.

46. Доклады о состоянии окружающей среды в городе Москве за 2017 год [Электронный ресурс]. URL: https://www.mos.ru/upload/documents/files/2074/bez_nazvaniya_9_.pdf.

47. Доклады о состоянии окружающей среды в городе Москва за 2010 год. [Электронный ресурс]. URL: https://www.mos.ru/upload/documents/oiv/doklad_o_sostoyanii_okruzhayushchey_sredy_v_gorode_moskve_v_2010_godu.pdf.

48. Abu-Bakar L., Ahamad-Zakeri H. Preliminary study on the potential of *Gracilaria sp*. as bioremediator of metals contamination: the dark-adapted quantum yield and chlorophyll a content // OIDA International journal of sustainable development. – 2012. – V.4. – N.6. –P.99-104

49. Amesz J. Light emission by plants and bacteria / Elsevier. 2012.

50. Antal T.K. Assessment of the effects of methylmercury and copper ions on primary processes of photosynthesis in green microalga *Chlamydomonas moewusii* by analysis of the kinetic curves of variable chlorophyll fluorescence / T.K. Antal // Biophysics (Russian Federation). – 2009. – V.54 – N.4. – P.481–485.

51. Appenroth K.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements / K.J. Appenroth // Environmental pollution. – 2001. – V.115 – N.1. – P.49–64.

52. Backor M. Comparison between growth responses of autotrophic and heterotrophic populations of lichen photobiont *Trebouxia irregularis* (Chlorophyta) in Cu, Hg and Cd / M. Backor // PHYTON-HORN-. – 1998. – V.38. – P.239–250

53. Bernier M. The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II / M. Bernier, R. Carpentier // FEBS Letters – 1995. – V.360 – N.3. – P.251–254.

54. Bertrand M. Photosynthetic organisms and excess of metals / M. Bertrand, I. Poirier // Photosynthetica – 2005. – V.43. – N.3. – P.345–353.

55. Campanella L. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments / L. Campanella // Water research. –2001. – V.35. – N1. – P.69–76.

56. Campanella L. New biosensor for superoxide radical used to evidence molecules of biomedical and pharmaceutical interest having radical scavenging properties / L. Campanella // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2000. – V.23 – N.1. – P.69–76.

57. Ceppi M.G. The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: A study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress / M.G. Ceppi // Physiologia plantarum. – 2012. – V.144 – N.3. – P.277–288.

58. Dau H. New trends in photobiology: Short–term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission / H. Dau // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 1994. – V.26 – N.1. – P.3–27.

59. Demidchik V. The effect of Cu^{2+} on ion transport systems of the plant cell plasmalemma / V. Demidchik // Plant physiology. –1997. – V.114. –N.4. – P.1313–1325.

60. Dinç E. The chl *a* fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl *a*/*b* ratio remains unaffected / E. Dinç, M.G. Ceppi, S.Z. Tóth, S. Bottka, G. Schansker, // Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics. – 2012. – V.1817. – N.5. – P.770-779.

61. De Grooth B.G. External electric field effects on prompt and delayed fluorescence in chloroplasts / B.G. De Grooth, H.J. Van Gorkom // Biochimica et biophysica acta (BBA) – bioenergetics. –1981. – V.635 – N.3. – P.445–456.

62. De Filippis L.F. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of Euglena / L.F. De Filippis, H. Ziegler // Journal of plant physiology. –1993. – V.142. –N.2. – P.167–172.

63. Doucha J., Measurement of in vivo absorption spectra of microscopic algae using bleached cells as a reference sample / J. Doucha, S. Kubin //Arch. hydrobiol. suppl. – 1976. – V.49. –P.199-213.

64. Falkowski, P.G. Aquatic photosynthesis / P.G. Falkowski, J.A. Raven // Massachusetts: blackwell science, 1997. 375 p.

65. Gao J. Photosynthetic performance during leaf expansion in *Malus micromalus* probed by chlorophyll a fluorescence and modulated 820 nm reflection / J. Gao // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2014. – V.137 – P.144–150.

66. Glazer A.N. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer // Glazer A. N. // Biochimica et biophysica acta (BBA)-reviews on bioenergetics. – 1984. – V.768. – N.1. – P.29-51.

67. Goltsev V. Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll a fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation / V. Goltsev, I. Zaharieva, I. Yordanov, R. Strasser // Journal of theoretical biology – 2003. – V.225 – N.2. – P.171–183.

68. Goltsev V. Delayed chlorophyll fluorescence as a monitor for physiological state of photosynthetic apparatus / V. Goltsev, I. Zaharieva, P. Chernev, R. Strasser // Biotechnol. & biotechnol. – 2009a. – V.23 – P.452–457.

69. Goltsev V. Delayed fluorescence in photosynthesis / V. Goltsev, I. Zaharieva, P. Chernev, R. Strasser // Photosynthesis research –2009b. – V.101 – N.2–3. – P.217–232.

70. Govindjee R. Sixty–three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence / R. Govindjee // Aust. J. plant. physiol. – 1995. – V.22 – P.131–160.

71. Grabolle M. Energetics of primary and secondary electron transfer in photosystem II membrane particles of spinach revisited on basis of recombination–fluorescence measurements / M. Grabolle, H. Dau // Biochimica et biophysica acta – bioenergetics. –2005. – V.1708 – N.2. – P.209–218.

72. Graevskaya E.E. Evaluation of diatomea algae *Thalassiosira weissflogii* sensitivity to chloride mercury and methylmercury by chlorophyll fluorescence analysis / E.E. Graevskaya, T.K. Antal, D. N. Matorin, E. N. Voronova, S. I. Pogosyan, A. B. Rubin // Journal de physique IV (Proceedings) – 2003. – V.107 – P.569–572.

73. Haveman J. Identification of the 120 μs phase in the decay of delayed fluorescence in spinach chloroplasts and subchloroplast particles as the intrinsic back reaction. The dependence of the level of this phase on the thylakoids internal pH // J. Haveman, J. Lavorel, // Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics. – 1975. – Т. 408. – №. 3. – С. 269-283.

74. Han C. Short–term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet–B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings / C. Han, Q. Liu, Y. Yang // Plant growth regulation. – 2009. – V.58 – N.2. – P.153–162.

75. Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. / M. Harada // Critical reviews in toxicology. – 1995. – V.25 – N.1. – P.1–24.

76. Holt J.S. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance / J.S. Holt, S.B. Powles, J.A. Holtum // Annual review of plant physiology. – 1993. – V.44 – N.1. – P.203–229.

77. Honeycutt R.C. Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate / R.C. Honeycutt, D.W. Krogmann // Plant physiology. –1972. –V.49. –N.3. – P.376–380.

78. Huang G.L. Temporal changes in the toxicity of pentachlorophenol to *Chlorella pyrenidosa* algae / G.L. Huang, Y. Mao, J.V. Headley, H.W. Sun // Journal of environmental science and health, Part B. – 2003. – V.38 – N.5. – P.551–559.

79. Itoh S. Studies on the delayed light emission in spinach chloroplasts. I. Nature of two phases in development of the millisecond delayed light emission during intermittent illumination / S. Itoh, N. Murata, A. Takamiya //Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics. – 1971. – V.245. – N.1. – P.109–120.

80. Itoh S. Correlation between delayed light emission and fluorescence of chlorophyll a in system II particles derived from spinach chloroplasts / S. Itoh, N. Murata //Photochemistry and photobiology. – 1973. – V.18. – N.3. – P.209–218.

81. Jassby A.D. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton / A.D. Jassby, T. Platt // Limnology and oceanography. – 1976. – V.21 – N.4. – P.540–547.

82. Juneau P. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application / P. Juneau, R. Popovic //Ecotoxicology. – 1999. – Т. 8. – №. 6. – С. 449-455.

83. Juneau P. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM–fluorometry / P. Juneau, D. Dewez, S. Matsui, S.G. Kim, R. Popovic // Chemosphere. – 2001. – V.45 – N.4–5. – P.589–598.

84. Kalaji H.M. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions / H. M. Kalaji, A. Jajoo, A. Oukarroum, M. Brestic, M. Zivcak, I.A. Samborska, ... R.J. Ladle // Acta physiologiae plantarum. – 2016. – V.38 – N.4. – P.102

85. Kalaji H.M. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues / H.M. Kalaji, G. Schansker, R. J. Ladle, V. Goltsev, K. Bosa, S. I. Allakhverdiev, ... N. I. Elsheery // Photosynthesis. –2014. –N.2. – P.121–158

86. Kojima Y. Destruction of photosystem I iron–sulfur centers of spinach and *Anacystis nidulans* by mercurials / Y. Kojima, Y. Niinomi, S.Tsuboi, T. Hiyama, H.Sakurai // Journal of plant. – 1987. – V.100. – N.3. – P.243–253.

87. Kováčik J. Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object / J. Kováčik, P. Babula, J. Hedbavny, O. Kryštofová, I. Provaznik // Chemosphere. – 2015. – V.120 – P.23–30.

88. Kramer D.M. New fluorescence parameters for the determination of Qa redox state and excitation energy fluxes / D.M Kramer, G. Johnson, O. Kiirats, G.E. Edwards // Photosynthesis research. – 2004. – V.79 – N.2. – P.209–218.

89. Krause G.H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics / G.H. Krause, E. Weis // Annual review of plant physiology and plant molecular biology. – 1991. – V.42 – N.1. – P.313–349.

90. Kukarskikh G. Effect of methylmercury chloride on the primary photosynthetic activity of higher plants / G.P. Kukarskikh, E.E. Graevskaia, O. G. Lavrukhina, T.E. Krendeleva, A.B. Rubin // Biofizika. – 2003. –V.49. –N.5. – P.832–839.

91. Kumar K.S. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence / K.S. Kumar, H.U. Dahms, J.S. Lee, H.C. Kim, W.C. Lee, K.H. Shin // Ecotoxicology and environmental safety – 2014. – V.104 – N.1. – P.51–71.

92. Lang M. Changes in the blue–green and red fluorescence–emission spectra of beech leaves during the autumnal chlorophyll breakdown / M. Lang, H.K. Lichtenthaler // Journal of plant physiology. – 1991. – V.138. – N.5. – P.550–553.

93. Lanza W.G. Association of a specific algal group with methylmercury accumulation in periphyton of a tropical high–altitude andean lake / W. G. Lanza, D. Achá, D. Point, J. Masbou, L. Alanoca, D. Amouroux, X. Lazzaro // Archives of environmental contamination and toxicology. – 2017. – V.72 – N.1. P.1–10.

94. Lazár D. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light / D. Lazár // Functional plant biology. –2006. –V.33. – N.1. – P.9–30.

95. Lazár D. Models of chlorophyll a fluorescence transients / D. Lazár, G. Schansker //Photosynthesis in silico. –2009. – P.85-123.

96. Lu C. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium , *S* . *platensis* - assessment by chlorophyll fluorescence analysis / C. M. Lu, C. W. Chau, J. H. Zhang, // Chemosphere. –2000. – V.41 – N.1–2. – P.191–196.

97. Luo H. Chromium (IV)–mediated fenton–like reaction causes DNA damage: Implication to genotoxicity of chromate / H. Luo, Y. Lu, X. Shi, Y.Mao, N.S. Dalal // Annals of Clinical and Laboratory Science. – 1996. – V.26 – N.2. – P.185–191.

98. Malkin S. Delayed Luminescence. In encyclopedia of plant physiology / Malkin S. –Berlin: Springer-Verlag, – 1977. – P.473–491.

99. Malkin S. Induction patterns of delayed luminescence fromisolated chloroplasts. I. Response of delayed luminescence to changes in the prompt fluorescence yield / S. Malkin, J. Barber //Biochimica et biophysica acta. – 1978. – V.502. – N.3. – P.524–541.

100. Malnoë A. Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis, which one is it? Update on newly termed sustained quenching component, qH. / F. Malnoë // Environmental and experimental botany. –2018.

101. Matorin D.N. The effect of phenols on the parameters of chlorophyll fluorescence and reactions of P700 in green algae Scenedesmus quadricauda / D.N Matorin, S.E. Plekhanov, L B. Bratkovskaya, O.V. Yakovleva, A.A. Alekseev // Biophysics (Russian Federation). –2014. – V.59 – N.3. – P.374–379.

102. Matorin D.N. Increased toxic effect of methylmercury on *Chlorella vulgaris* under high light and cold stress conditions / D.N. Matorin, V.A. Osipov, N.K. Seifullina, P.S. Venediktov, A.B. Rubin, // Microbiology. – 2009. – V.78. – N.3. – P.321–327.

103. Merchant S. The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery. / S. Merchant, M.R. Sawaya // The plant cell. – 2005. – V.17 – N.3. – P.648–63.

104. Mi H. Light–induced dynamic changes of NADPH fluorescence in *Synechocystis* PCC 6803 and its ndhB–defective mutant M55 / H. Mi, C. Klughammer, U. Schreiber // Plant and cell physiology. – 2000. – V.41 – N.10. – P.1129–1135.

105. Miles D. Hg^{++} — A DCMU independent electron acceptor of photosystem II / D. Miles, P. Bolen, S. Farag, R. Goodin, J. Lutz, A. Moustafa, B. Rodriguez // Biochemical and biophysical research communications. – 1973. – V.50 – N.4. – P.1113–1119.

106. Moon Y.J. Sensing and responding to UV–A in cyanobacteria / Y.J. Moon, S.I. Kim, Y.H. Chung, // International journal of molecular sciences. – 2012. – V.13 – N.12. – P.16303–16332.

107. Murthy S.D.S. Mercury-induced inhibition of photosystem II activity and changes in the emission of fluorescence from phycobilisomes in intact cells of the cyanobacterium, Spirulina platensis / S. D. S. Murthy, S. C. Sabat P. Mohanty //Plant and cell physiology. – 1989. – Т. 30. – №. 8. – С. 1153-1157.

108. Murthy S.D.S. Mercury–induced alterations of chlorophyll a fluorescence kinetics in cyanobacteria: Multiple effects of mercury on electron transport / S.D.S. Murthy, N. G. Bukhov, P. Mohanty // Journal of photochemistry and photobiology, B: Biology. – 1990. – V.6 – N.4. – P.373–380.

109. Nath K. Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress ... / K. Nath, A. Jajoo, R.S. Poudyal, R.Timilsina, Y.S. Park, E.M. Aro, C.H. Lee, // FEBS Letters. – 2014. – V.587 – N.21. – P.3372–3381.

110. Niyogi K.K. Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? / K.K. Niyogi, X.P. Li, V. Rosenberg, H.S. Jung //Journal of experimental botany. – 2004. –V.56. – N.411. – P.375–382.

111. O'Connor D.V. Time correlated single photon counting / D.V. O'Connor, D. Phillips. – London: academic press, 1984.

112. Ochiai E.I. General principles of biochemistry of the elements. – Springer science & business media. 2012. – V.7.

113. Oukarroum A. Differential heat sensitivity index in barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) monitored by chlorophyll a fluorescence OKJIP / A. Oukarroum, S. El Madidi, R.J. Strasser // Plant physiology and biochemistry. –2016. – V.105 – P.102–108.

114. Oukarroum A. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance / A. Oukarroum, G. Schansker, R.J. Strasser // Physiologia plantarum – 2009. – V.137 – N.2. – P.188–199.

115. Pacyna E.G. Pacyna et al 2010 Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020 / E.G. Pacyna, J.M. Pacyna, K. Sundseth, J. Munthe, K. Kindbom, S. Wilson, ... P. Maxson // Atmospheric environment. – 2010. – V.44. – N.20. – P.2487–2499.

116. Päivöke A.E.A. Soil pollution alters ATP and chlorophyll contents in *Pisum sativum* seedlings / A.E.A. Päivöke // Biologia plantarum. –2003. –V.46. –N.1. – P.145–148.

117. Pätsikkä E. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo / E. Pätsikkä, E.M. Aro, E. Tyystjärvi, // Plant physiology. –1998. –V.117. –N.2. –P.619–627.

118. Perminova I.V. Quantification and prediction of the detoxifying properties of humic substances related to their chemical binding to polycyclic aromatic hydrocarbons / I. V. Perminova, N. Y. Grechishcheva, D. V. Kovalevskii, A. V. Kudryavtsev, V. S. Petrosyan, D. N. Matorin // Environmental science and technology. – 2001. – V.35. –N.19. – P.3841–3848.

119. Pinnola A. Molecular mechanisms involved in plant photoprotection / A. Pinnola, R. Bassi // Biochemical society transactions. – 2018. – V.46 – N.2. – P.467–482.

120. Platt T. Modelling the productivity of phytoplankton, – 1977. – P807–856.

121. Poirier I. Plastids and metals / I. Poirier, N. Jean, M. Bertrand //Plant cell compartments—selected topics. Research signpost. – 2008. – P. 285-307.

122. Rastogi, R.P. Ultraviolet radiation and cyanobacteria / R.P. Rastogi, R.P Sinha, S.H. Moh, T.K. Lee // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2014. – V.141 – P.154–169.

123. Rauser W.E. Structure and function of metal chelators produced by plants / W.E. Rauser // Structure and function of metal chelators produced by plants. – 1999. – V.31 – N.1. – P.19–48.

124. Renger G. Studies on the reaction coordinates of the water oxidase in PS II membrane fragments from spinach / G. Renger, B. Hanssum // FEBS Letters. – 1992. – V.299 – N.1. – P.28–32.

125. Roháček K. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress / K. Roháček, J. Soukupová, M. Barták //Plant cell compartments-selected topics. – 2008. – P.41-104.

126. Sadvakasova A.K. Pigment mutants of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* : morphological properties and photosynthetic performance / A.K. Sadvakasova, N.R. Akmukhanova, B.K. Zayadan, D.N. Matorin, F.F. Protopopov, A.A. Alekseev, K. Bolatkhan // Russian journal of plant physiology – 2016. – V.63 – N.4. – P.443–450.

127. Samson G., Inhibitory effects of mercury on photosystem II photochemistry in *Dunaliella tertiolecta* under in vivo conditions / G. Samson, R. Popovic //Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 1990. – V. 5. – N.3-4. – P.303-310.

128. Sandmann G. Sites of herbicide inhibition at the photosynthetic apparatus / G. Sandmann, P. Boger // Encyclopedia of plant physiology: New series –1986.

129. Schansker G. Quantification of non–QB –reducing centers in leaves using a far–red pre–illumination / G. Schansker, R.J. Strasser // Photosynthesis research – 2005. – V.84. – N.1–3. – P.145–151.

130. Schreiber U. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis / U. Schreiber, H. Hormann,, C. Neubauer, C. Klughammer // Functional plant biology. – 1995. – V.22. –N.2. – P.209–220.

131. Schreiber U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview / U. Schreiber //Chlorophyll a fluorescence. –2004. – P.279-319.

132. Singh D.P. Effect of Ni^{2+}, Hg^{2+} and Cu^{2+} on growth, oxygen evolution and photosynthetic electron transport in Cylindrospermum IU 942 / D.P. Singh, P. Khare, P.S. Bisen // Journal of plant physiology. – 1989. – V.134. – N.4. – P.406–412.

133. Sonneveld A. Magnetic field–induced increase in chlorophyll a delayed fluorescence of photosystem II: A 100– to 200–ns component between 4.2 and 300 K. / A. Sonneveld, L.N. Duysens, A, Moerdijk // Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America – 1980. – V.77 – N.10. – P.5889–5893.

134. Stirbet A. Excitonic connectivity between photosystem II units: what is it, and how to measure it? / A. Stirbet //Photosynthesis research. – 2013. – T. 116. – N. 2-3. – C. 189-214.

135. Stirbet A. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient / A. Stirbet, U. Govindjee // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology – 2011. – V.104 – N.1–2. – P.236–257.

136. Stohs S.J. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions / S.J. Stohs, D. Bagchi // Free radical biology and medicine. – 1995. – V.18. – N.2. – P.321–336.

137. Strasser R.J. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plant and cyanobacteria / Strasser // Photochemestry and photobiology. – 1995. – V.61. – N.1. – P.32–42.

138. Strasser R.J. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples / R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael // Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. – 2000. – P.443–480.

139. Strasser R.J. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P – Fitting of experimental data to three

different PS II models / R.J. Strasser, A.D. Stirbet // Mathematics and computers in simulation. – 2001. – V.56. – N.4–5. – P.451–461.

140. Strasser R.J. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient / R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava // Chlorophyll a fluorescence. – Springer, Dordrecht, 2004. –P.321–362.
141. Strasser R.J. 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* / R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, S. Qiang, V. Goltsev // Biochimica et biophysica acta – bioenergetics. – 2010. – V.1797 – N.6–7. – P.1313–1326.
142. Strehler B.L. light production by green plants / B.L. Strehler, W. Arnold // The journal of general physiology –1951. –V.34 –N.6. –P.809–20.
143. Tóth S.Z. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron donors to photosystem II / S. Z. Tóth, G. Schansker, G. Garab, R.J. Strasser, //Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics. – 2007. – V.1767. – N.4. – P.295-305.
144. Tóth S.Z. A non–invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP–transient / S.Z. Tóth, G. Schansker, R.J. Strasser // Photosynthesis research. – 2007. – V.93. – N.1–3. – P.193–203.
145. Tsimilli–Michael M. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and Azospirillum and Rhizobium nitrogen–fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O–J–I–P / M. Tsimilli-Michael, P. Eggenberg, B. Biro, K. Köves-Pechy, I. Vörös, R.J. Strasser // Applied Soil Ecology. – 2000. – V.15. – N.2. – P.169–182.
146. Vasil’ev I.R. Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence / I.R. Vasil'ev, D.N. Matorin, V.V. Lyadsky, P. S. Venediktov // Photosynthesis research. – 1988. – V.15. – N.1. – P.33–39.
147. Van Rensen J. J. S. Herbicides interacting with photosystem II / J. J. S. Van Rensen //Herbicides and plant metabolism. – 1989. – N.38. – P. 21.

148. Vavilin D. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* / D.V. Vavilin, V.A. Polynov, D.N. Matorin, P. S. Venediktov // Journal of plant physiology. –1995. –V.146. –N.5-6. –P.609-614.

149. Vermaas W.F. Synthetic quinones influencing herbicide binding and photosystem II electron transport. The effects of triazine–resistance on quinone binding properties in thylakoid / W.F. Vermaas, C.J. Arntzen // Biochimica et biophysica acta (BBA)–bioenergetics. – 1983. – V.725 – N.3. – P.483–491.

150. Wang G. Effects of salinity stress on the photosynthesis of *Wolffia arrhiza* as probed by the OJIP test / G. Wang, L. Chen, Z. Hao, X. Li, Y. Liu // Fresenius Environmental Bulletin. – 2011. – V.20. – P.432–438.

151. Wu Y. Accumulation, subcellular distribution and toxicity of inorganic mercury and methylmercury in marine phytoplankton / Y. Wu, W. Wang // Environmental pollution. – 2011. – V.159. – N.10. – P.3097–3105.

152. Wu Y. Differential acclimation of a marine diatom to inorganic mercury and methylmercury exposure / Y. Wu, W. Wang // Aquatic toxicology. – 2013. – V.138. – P.52–59.

153. Wu Y. Mercury effects on *Thalassiosira weissflogii*: applications of two–photon excitation chlorophyll fluorescence lifetime imaging and flow cytometry / Y. Wu, Y. Zeng, J.Y. Qu, W.X. Wang // Aquatic toxicology. – 2012. – V.110. – P.133–140.

154. Xia J. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*–OJIP chlorophyll a fluorescence analysis / J. Xia, Q. Tian // Journal of environmental sciences. – 2009. – V.21. – N.11. – P.1569–1574.

155. Xue L. Effects of enhanced ultraviolet–B radiation on algae and cyanobacteria / L. Xue, Y. Zhang, T. Zhang, L. An, X. Wang // Critical reviews in microbiology. – 2005. – V.31. – N.2. – P.79–89.

156. Zayadan B.K. Isolation, mutagenesis, and optimization of cultivation conditions of microalgal strains for biodiesel production / B.K. Zayadan, S. Purton,

A.K. Sadvakasova, A.A. Userbaeva, K. Bolatkhan, // Russian journal of plant physiology. – 2014. – V.61. – N.1. – P.124–130.

157. Zaydan B.K. Generation and characterization of pigment mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* CC–124 / B.K. Zaydan, A.K. Sadvakasova, M.M. Saleh, M.M. Gaballah // African journal of biotechnology. – 2014. – V.13. – N.8. – P.910–915.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица. 6. Список расчета формул параметров флуоресценции JIP-теста с их описанием (Strasser et al., 2010; Гольцев и др., 2014).

Измеряемые параметры флуоресценции	
$\mathbf{F_t}$	Флуоресценция, излучаемая в момент времени t, с момента включения освещения
$\mathbf{F_O}$	Минимальный сигнал флуоресценции, зарегистрированный при 20 мкс или 50 мкс
$\mathbf{F_{100мкс}}$	Интенсивность флуоресценции при 100 мкс
$\mathbf{F_{300мкс}}$	Интенсивность флуоресценции при 300 мкс
$\mathbf{F_J}$	Интенсивность флуоресценции при 2 мс во время фазы J
$\mathbf{F_I}$	Интенсивность флуоресценции при 30 мс во время фазы I
$\mathbf{F_P}$ $=F_M$	Максимальная флуоресценция во время фазы P
$\mathbf{t_{FM}}$	Время (мс), необходимое для достижения максимальной флуоресценции FM
$\mathbf{A_M}$ (или Area)	Площадь над индукционной кривой флуоресценции (OJIP)
Вычисляемые параметры флуоресценции	
$\mathbf{F_V}=F_M-F_O$	Максимальная переменная флуоресценция
$\mathbf{V_J}=(F_J - F_O)/F_V$	Относительная амплитуда O-J фазы. Отражает количество закрытых РЦ по отношению к общему числу РЦ, которые могут быть закрыты
$\mathbf{V_I}=(F_I - F_J)/F_V$	Относительная амплитуда J-I фазы. Отражает способность ФС1 и ее акцепторов

	окислять PQH_2 (пластохинол)
$\mathbf{V_{OJ}}=\mathbf{V_J}=(F_t - F_O)/(F_J - F_O)$	Относительная переменная флуоресценция, нормированная к амплитуде фазы O-J
$\mathbf{V_{OK}}=\mathbf{V_K}=(F_t - F_O)/(F_{300мкс} - F_O)$	Относительная переменная флуоресценция, нормированная к амплитуде фазы O-K
$\mathbf{M_O}=4\times(F_{300мкс} - F_{50мкс})/F_V$	Начальный наклон фазы O-J роста флуоресценции. Отражает скорость закрывания РЦ ФС2
$\mathbf{S_M}=(A_M)/F_V$	Нормированная площадь над индукционной кривой флуоресценции OJIP. Отражает емкость пула электронных акцепторов до полного восстановления Q_A
$\mathbf{ABS/RC}=M_O\times(1/V_J)\times(1/\varphi_{Po})$	Поток энергии, поглощаемый одним активным РЦ
$\mathbf{TR_O/RC}=M_O\times(1/V_J)$	Поток энергии возбуждения, улавливаемой одним активным РЦ
$\mathbf{Dl_O/RC}=ABS/RC - TR_O/RC$	Общее количество энергии, рассеиваемой одним РЦ в виде тепла
$\boldsymbol{\varphi_{Po}}= TR_O/ABS=F_V/F_M$	Максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции
$\boldsymbol{\varphi_{Eo}}= ET_O/ABS= \varphi_{Po}\times\psi_0$	Квантовая эффективность переноса электронов от Q_A^-
$\boldsymbol{\psi_0}= ET_O/ TR_O=(1 - V_J)$	Вероятность транспорта электронов за пределы Q_A^-
$\boldsymbol{\delta_{Ro}}= RE_O/ ET_O = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Вероятность редукции крайних акцепторов ФС1
$\boldsymbol{\varphi_{Ro}}= \varphi_{Po} \times \varphi_{Eo} \times \delta_{Ro}= RE_O/ABS= \varphi_{Po}\times(1 - V_I)$	Квантовый выход восстановления крайних акцепторов ФС1
$\boldsymbol{\varphi_{Do}}=1 - \varphi_{Po}=(F_O - F_M)$	Квантовая эффективность рассеивания

	энергии в виде тепла
$\mathbf{PI_{ABS}}$=(RC/ABS)× $(\varphi_{Po}/(1-\varphi_{Po}))\times(\psi_0/(1-\psi_0)$	Показатель функциональной активности ФС2, индекс производительности ФС2
$\mathbf{PI_{total}}=PI_{ABS}\times(\delta_{Ro}/(1-\delta_{Ro}))$	Индекс производительности – показатель функциональной активности ФС2, ФС1 и цепи переноса электронов между ними.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

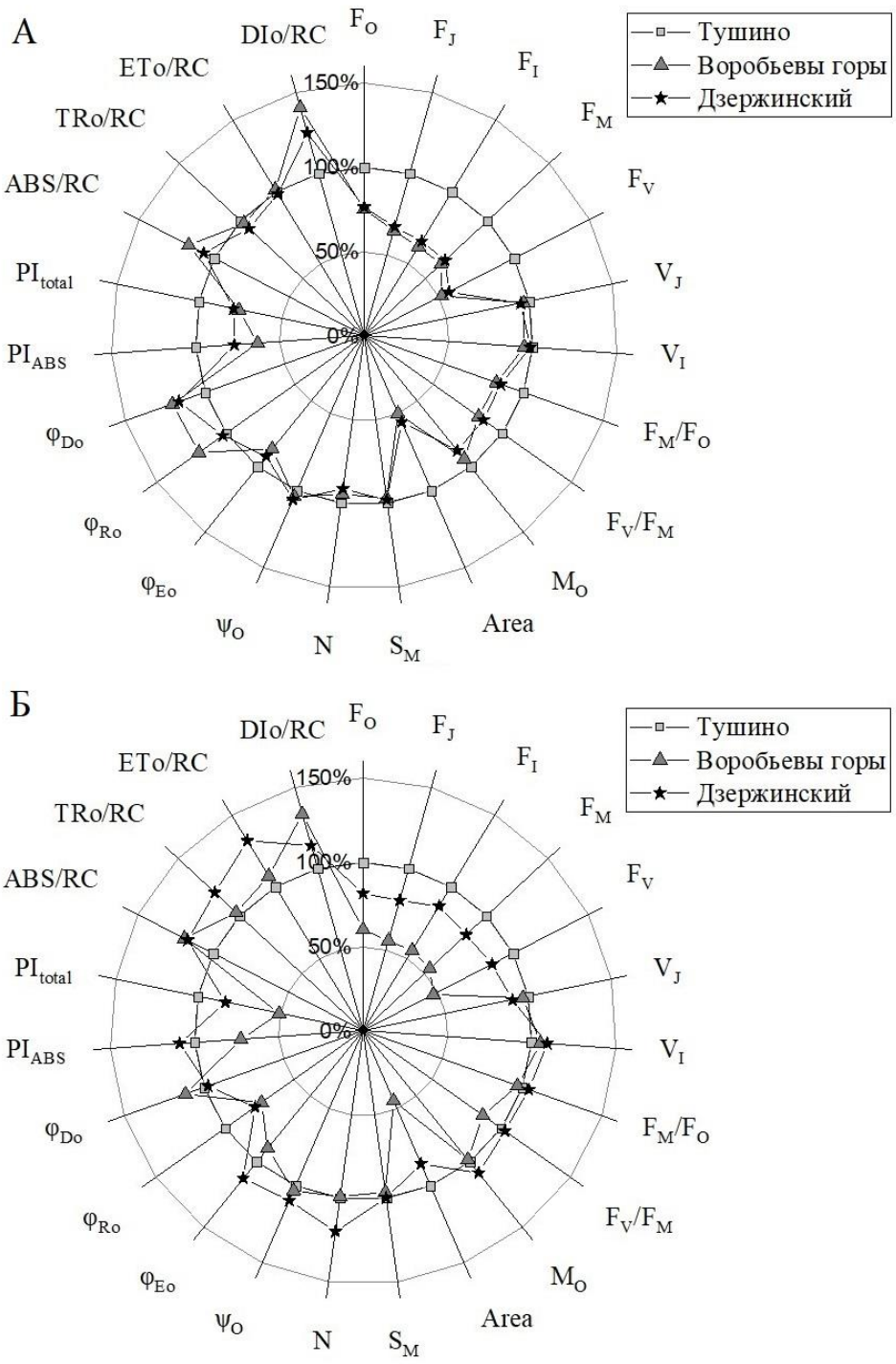

Рис. 29. Представлены параметры JIP-теста флуоресценции хлорофилла фитопланктона Москвы-реки, значения параметров флуоресценции станции Тушино приняты за 100%. Данные получены 2017 году в мае (А) и в июле (Б). Символами обозначены средние значения не менее чем 10 повторностей.