МИКРОБИОЛОГИЯ, 2017, том 86, № 1, с. 62–71

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ХРОМАТА НА МОРСКИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

© 2017 г. Д. Т. Габбасова[a], Д. Н. Маторин[a, *], И. В. Конюхов[a], Н. Х. Сейфуллина[a], Б. К. Заядан[b]

[a] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*

[b] *Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан*

**e-mail: matorin@biophys.msu.ru*

Поступила в редакцию 28.07.2016 г.

Изучено действие ионов хромата на культуру морской диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* с использованием флуориметра M-PEA-2, позволяющего одновременно измерять в миллисекундном интервале индукционные кривые флуоресценции и окислительно-восстановительные превращения пигмента P_{700}. Показано, что ионы хромата ингибируют электронный транспорт в ФС II и снижают скорость восстановления Q_A. Происходит уменьшение квантового выхода электронного транспорта в ФС II (φ_{Eo}), индекса производительности (PI_{ABS}) и замедление восстановления пигмента P_{700}, а также увеличение рассеивания энергии (DI_0/RC) и ΔpH-зависимого нефотохимического тушения (q_E). Обнаружено появление медленной компоненты восстановления P_{700}, что свидетельствует об активации циклического транспорта в присутствии хромата. Наиболее чувствительным параметрам оказался индекс производительности (PI_{ABS}), который можно предложить для обнаружения появления хромат-ионов в среде на ранних стадиях токсического воздействия. Параметр флуоресценции F_O перспективно использовать для оценки скорости роста водорослей при биотестировании.

Ключевые слова: *Phaeodactylum tricornutum*, ионы хрома, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, биотестирование, JIP-тест, M-PEA-2

DOI: 10.7868/S0026365617010062

Соединения хрома, особенно хромат-ионы, которые находят в составе сточных вод многих предприятий, являются токсичными для водных экосистем. Они также рекомендованы как эталонный токсикант для проверки чувствительности культур водорослей в стандартных методах биотестирования (Заядан, Маторин, 2015).

Ранее показано, что при действии этого токсиканта на микроводоросли наблюдается нарушение механизмов согласования процессов метаболизма клеток, подавление двигательной активности микроводорослей, снижение их численности (Giloni-Lima et al., 2010), снижение концентрации хлорофилла и нарушение фотосинтеза (Rai et al., 2004; Rodríguez et al., 2007; Rocchetta, Küpper, 2009). Показано, что при ингибировании фотосинтеза ионами хромата нарушения затрагивают реакции второй фотосистемы (ФС II) (Appenroth et al., 2001; Ali et al., 2006; Hörcsik, 2007; Didur et al., 2013).

Современные представления о переносе электрона по фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) предполагают последовательное участие двух фотосистем (ФС II и ФС I), при котором переносчики, восстановленные ФС II, служат донорами электронов для ФС I. Согласно Z-схеме ЭТЦ, активность каждой из фотосистем оказывает влияние на окислительно-восстановительное состояние другой фотосистемы. Такая связь между ФС II и ФС I проявляется во флуоресценции хлорофилла, уровень которой зависит от редокс-состояния хинонного акцептора Q_a. Фотореакция ФС II восстанавливает Q_a, повышая уровень флуоресценции, а активность ФС I приводит к окислению Q_a и снижению флуоресценции (Lazár, Schansker, 2009; Strasser et al., 2010). Кинетики световой индукции переменной флуоресценции в миллисекундном диапазоне отражают кинетику электронного транспорта внутри ФС II и между ФС II и ФС I (Lazar, Schansker, 2009; Strasser et al., 2010; Гольцев и соавт., 2014). Измерение кинетики индукции флуоресценции все шире используется в микробиологических и экологических исследованиях. За состоянием ФС I возможно следить по изменениям поглощения в области 820–830 нм (редокс-состояния хлорофилла ФС I – P_{700}). На индуктофлуориметре M-PEA-2 появилась возможность на одном образце регистрировать флуоресценцию хлорофилла и редокс-состояние P_{700}, то есть одновременно следить за от-

дельными реакциями ФС II и ФС I и проводить регистрацию индукционных изменений замедленной флуоресценции (ЗФ) (Susplugas et al., 2000; Маторин и соавт., 2012; Гольцев и соавт., 2014). Однако для морских водорослей этот методический прием ранее не использовали.

В настоящей работе с использованием индуктофлуориметра M-PEA-2 проведены исследования изменения процессов фотосинтеза у морских водорослей *Phaeodactylum tricornutum* после воздействия хромат-ионов. Целью работы было определить мишени преимущественного воздействия хромат-ионов на реакции фотосинтеза морских водорослей и выявить наиболее чувствительные параметры флуоресценции хлорофилла для использования при биотестировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила альгологически чистая культура морской одноклеточной диатомовой водоросли *P. tricornutum* из коллекции кафедры гидробиологии МГУ, выделенная из фитопланктона Черного моря. Культуру выращивали на искусственной морской воде с концентрацией соли 20 г/л и внесением KNO_4 (0.202 г/л), NaH_2PO_4 ($0.71 \cdot 10^{-2}$ г/л), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($0.19 \cdot 10^{-3}$ г/л), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0.24 \cdot 10^{-3}$ г/л), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ($0.27 \cdot 10^{-3}$ г/л) (питательная среда Гольдберга в модификации Кабановой) при температуре 20 ± 2°C и освещенности 30 мкЕ/(м^2 с) 16 ч в сутки.

Культуру микроводоросли, выращенной в течение 3 сут, разливали по 100 мл в отдельные емкости, добавляли шестивалентный хром в виде $K_2Cr_2O_7$ до концентраций от 2.5 до 25 мг/л ("Sigma Inc.", США) и экспонировали в тех же условиях, что и при выращивании культуры. Концентрация клеток перед добавлением хромата в стационарной фазе, составляла 10^6 кл/мл. Численность микроводорослей определяли микроскопически методом прямого счета в камере Горяева.

Параметры флуоресценции хлорофилла в интактных клетках водорослей регистрировали в кюветах на импульсном портативном флуориметре Aqua-Pen-C AP–C100 ("Photon Systems Instruments", Брно, Чехия) при освещении красным светом (λ = 650 нм, 3000 мкЕ/(м^2 с)). Перед измерением образцы выдерживали в темноте в течение 30 мин. Индукционные кривые быстрой (БФ) и замедленной (ЗФ) флуоресценции хлорофилла, а также окислительно-восстановительные превращения P_{700}, измеряли одновременно с помощью прибора Multi-function Plant Efficiency Analyser (M-PEA-2, "Hansatech Instruments", Великобритания) (Strasser et al., 2010; Bulychev et al., 2013; Гольцев и соавт., 2014). Регистрацию быстрой и замедленной флуоресценции производили при чередовании красного света (интенсивность 1300 мкЕ/(м^2 с), 625 нм) и темновых интервалов малой длительности, достаточных для регистрации ЗФ. Динамика ЗФ отражала изменения интенсивности свечения в диапазоне 0.1–0.9 мс в интервалах между импульсами действующего света. Изменения поглощения при длине волны 820 нм отражают редокс-состояние P_{700}, реакционного центра ФС I (Гольцев и соавт., 2014). Интенсивность модулирующего света при длине волны 820 ± 25 нм составляла 1000 мкЕ/(м^2 с). Полученные данные нормировали на значение при t = 0.7 мс (MR_O) (Гольцев и соавт., 2014). Характеристики и протокол измерений на M-PEA-2 подробно описан ранее (Bulychev et al., 2013; Oukarroum et al., 2013; Гольцев и соавт., 2014). Измерения проводили на образцах водорослей, которые концентрировали на мембранном фильтре и выдерживали в темноте в течение 10 мин во влажном состоянии.

Измерение кинетики восстановления P_{700}^+ проводили *in vivo* на двухволновом (830 нм/900 нм) приборе, созданном на кафедре биофизики МГУ (Solovchenko et al., 2015). Измерение проводили по изменениям поглощения на длине волны 830 нм с разрешением 0.5 мс. Образец освещали актиничным светом (700 нм) интенсивностью 5000 мкЕ/(м^2 с) в течение 20 мс, и после выключения света регистрировали кинетику восстановления P_{700}^+ электронами, поступающими на ФС I.

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе OJIP параметров кинетической кривой, был использован так называемый JIP-тест (Lazar, Schansker, 2009; Strasser et al., 2010; Гольцев и соавт., 2014). JIP-тест использует следующие параметры кривой индукции флуоресценции: интенсивность при 20 мкс (F_O), 2 мс (F_J), 30 мс (F_I), 6 с (F_{6s}), а также F_P (F_M, максимальная интенсивность флуоресценции) и M_0 (площадь над кинетической кривой OJIP, но ниже уровня F_M).

Эти измеряемые величины использовали для расчета следующих параметров:

$F_V = F_M - F_O$ – максимальная переменная флуоресценция;

F_V/F_M – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФС II: $F_V/F_M = \varphi_{Po}$;

φ_{Eo} – квантовый выход электронного транспорта (при t = 0): $\varphi_{Eo} = [1 - (F_O/F_M)]\ (1 - V_J)$ где $V_J = (F_J - F_O)/F_V$;

$DI_0/RC = (ABS/RC) - M_0\ (1/V_J)$ – общее количество энергии, рассеиваемой одним реакцион-

ным центром (RC) в виде тепла, флуоресценции или переноса к другой фотосистеме, при $t = 0$;

ABS/RC – поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром (РЦ), характеризует относительный размер антенны (ABS): $ABS/RC = M_0/V_J\ (1/\varphi_{Po}) = (M_0/V_J)/[(F_M - F_O)/F_M)]$;

PI_{ABS} – индекс производительности, показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии: $PI_{ABS} = [1 - (F_O/F_M)]/(M_0/V_J)[(F_M - F_O)/F_O][(1 - V_J)/V_J]$;

q_E – способность к pH-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции: $q_E = (F_M - F_{6s})/F_V$.

Спектры поглощения клеточных суспензий водорослей измеряли в диапазоне 400–850 нм однолучевым спектрофотометром с интегрирующей сферой на основе спектрометра USB2000 (“Ocean Optics”, США) (Solovchenko et al., 2015).

Все измерения проводили не менее чем в пяти повторностях. На рисунках представлены данные средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что хромат-ионы уменьшают скорость роста морских микроводорослей *P. mricornutum*, начиная с концентрации 2.5 мг/л (рис. 1). При концентрации $K_2Cr_2O_7$ 5 мг/л отмечалось 50%-ное ингибирование роста культур. Ингибирование роста при действии солей хрома отмечалось у различных пресноводных водорослей (Ali et al., 2006; Khalida, 2012). Снижение скорости роста и синтеза хлорофилла были показаны и для водных высших растений *Spirodela polyrhiza* и *Vallisneria spiralis* (Appenroth et al., 2001; Vajpayee et al., 2001).

Ранее отмечали, что интенсивность флуоресценции морских водорослей (F_0) коррелирует с содержанием хлорофилла и может служить показателем численности клеток водорослей (Маторин и соавт., 2012; Matorin et al., 2004). Результаты экспериментов показали, что тест-функция прироста численности клеток водорослей (N) и показатели флуоресценции (F_0), хорошо согласуются друг с другом с коэффициентами корреляции не меньше 0.90. Этот факт подтверждает возможность использования показателя флуоресценции (F_0) для биотестирования соленых вод с использованием микроводоросли *P. tricornutum* в качестве тест-объекта. Использование показателя флуоресценции (F_0) для биомониторинга и биотестирования ранее было предложено для культур водорослей (Жмур, 2009) и фитопланктона (Маторин и соавт., 2012).

На рис. 2 приведены спектры поглощения *P. tricornutum* после воздействия различных концентраций хромат-ионов. Эти спектры нормированы на красный максимум поглощения хлорофилла *a* при 678 нм. Спектры контрольных водорослей были типичными для диатомовых водорослей с наличием максимумов при 640 нм (хлорофилл *c*) и 678 нм (хлорофилл *a*) (Falkowski, Raven, 1997). При инкубации менее 24 ч у клеток в присутствии хромат-ионов не отмечалось изменений в спектрах. Однако при более длительной инкубации фиксировали относительное увеличение поглощения в области каротиноидов (430–480 нм) по сравнению с контролем, что обычно происходит при действии стрессовых факторов (Falkowski, Raven, 1997). Количество хлорофилла *c* немного снижалось только при высоких концентрациях хромат-ионов (выше 20 мг/л).

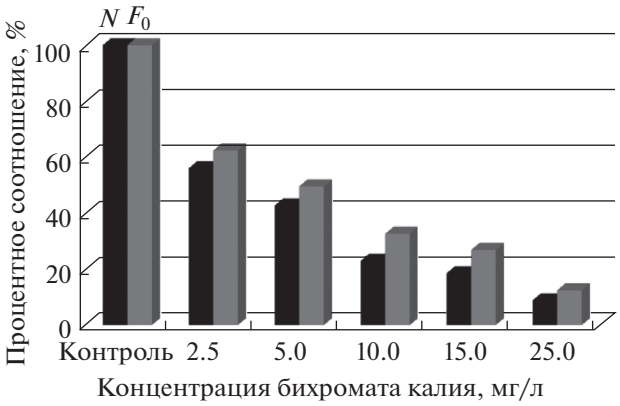

Рис. 1. Изменение прироста численности клеток (N) и значения флуоресценции (F_0) микроводорослей *P. tricornutum* через 72 ч инкубации в зависимости от концентрации $K_2Cr_2O_7$ (в % от контроля).

Флуоресцентные методы дают подробную информацию о начальных нарушениях активности фотосинтетического аппарата. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтез свете (F_M) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_O) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов ФС II, которая равна $(F_M - F_O)/F_M = F_V/F_M$. Параметр F_V/F_M представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия. Проведенные исследования *P. tricornutum* показали, что максимальный квантовый выход первичных фотохимических реакций F_V/F_M (φ_{Po}) у контрольных клеток находится на высоком уровне (0.612) (табл. 1). Напротив, при действии различных концентраций хромат-ионов уже через нескольких часов инкубации наблюдали снижение этого параметра. Изменения F_V/F_M происходили, глав-

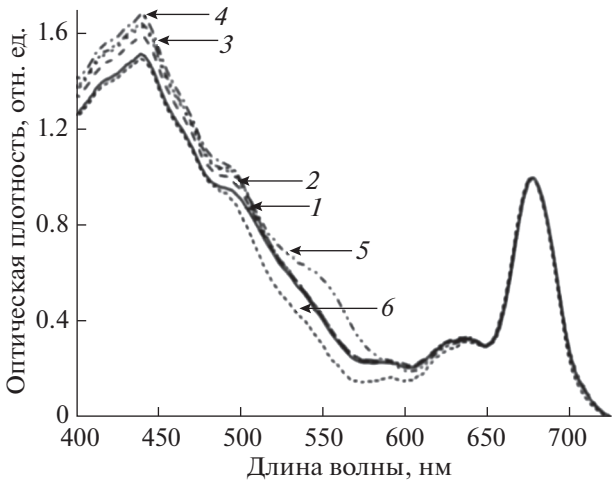

Рис. 2. Спектры поглощения клеток микроводорослей *P. tricornutum* при различных концентрациях $K_2Cr_2O_7$: *1* – контроль, *2–6* – клетки, инкубированные в течение 24 ч в присутствии $K_2Cr_2O_7$ (2.5; 5; 10; 15; 25 мг/л соответственно). Спектры нормированы на красный максимум хлорофилла *a* при длине волны 678 нм.

ным образом, за счет уменьшения амплитуды максимальной флуоресценции F_M. Следует отметить, что при коротких (в течение нескольких часов) инкубации водорослей с хромат-ионами F_O и, соответственно, количество клеток мало изменялись. При этом при коротких инкубациях практически не изменялись спектры поглощения суспензий водорослей (данные не показаны), что свидетельствует об отсутствии влияния на пигментный аппарат. Поэтому изменения в фотосинтетической активности по F_V/F_M позволяют зарегистрировать эффект на ранних стадиях токсического воздействия.

Для детальной оценки изменений фотосинтетической активности в клетках *P. tricornutum* измерены индукционные кривые быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния P_{700}. На рис. 3а представлены кинетические кривые индукции флуоресценции (OJIP), нормированные по уровню F_O. У контрольных клеток кривая флуоресценции соответствовала кривой, описанной в литературе (Lazár, Schansker, 2009; Strasser et al., 2010). В кинетике индукции флуоресценции в ответ на свет высокой интенсивности обычно наблюдается несколько стадий, известных как O–J–I–P переходы (Strasser et al., 2010). Начальный уровень O соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при “открытых” РЦ ФС II (F_O), когда все 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 хинонов.

Для проведения количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на ос-

Таблица 1. Параметры OJIP кинетики флуоресценции индукционных кривых микроводорослей *P. tricornutum* при действии $K_2Cr_2O_7$ в различных концентрациях через 24 ч инкубации, % от контроля

Параметр	Контроль	Концентрация $K_2Cr_2O_7$, мг/л				
		2.5	5	10	15	25
F_V/F_M	0.612 ± 0.093 100%	0.571 ± 0.021 93%	0.539 ± 0.049 88%	0.535 ± 0.027 87%	0.529 ± 0.110 86%	0.532 ± 0.062 87%
F_V/F_O	1.575 ± 0.617 100%	1.329 ± 0.120 84%	1.168 ± 0.282 74%	1.149 ± 0.170 73%	1.123 ± 0.368 71%	1.138 ± 0.110 72%
φ_{Eo}	0.359 ± 0.013 100%	0.290 ± 0.040 81%	0.303 ± 0.039 84%	0.305 ± 0.019 85%	0.277 ± 0.040 77%	0.267 ± 0.033 74%
PI_{ABS}	0.739 ± 0.104 100%	0.397 ± 0.104 54%	0.408 ± 0.102 55%	0.401 ± 0.059 54%	0.329 ± 0.052 45%	0.299 ± 0.042 40%
ABS/RC	3.024 ± 0.272 100%	3.469 ± 0.235 115%	3.668 ± 0.261 121%	3.802 ± 0.171 126%	3.747 ± 0.851 124%	3.838 ± 4.682 127%
DI_0/RC	1.174 ± 0.453 100%	1.489 ± 0.189 127%	1.691 ± 0.244 144%	1.769 ± 0.156 151%	1.765 ± 1.154 150%	1.795 ± 4.086 153%
q_E	1.63 ± 0.013 100%	1.75 ± 0.044 107%	1.86 ± 0.021 114%	1.87 ± 0.019 114%	1.89 ± 0.039 116%	1.88 ± 0.024 115%
V_K	0.100 ± 0.056 100%	0.128 ± 0.027 127%	0.117 ± 0.031 117%	0.121 ± 0.049 121%	0.128 ± 0.051 127%	0.137 ± 0.066 137%

нове параметров кинетической кривой O–J–I–P использовали “JIP-тест” (рис. 3), параметры которого описаны в разделе “Материалы и методы”.

Амплитуда фазы JIP, нормированная к амплитуде OJ или OP, может характеризовать вероятность электронного транспорта с Q_A в пул пластохинонов (ПХ) (Strasser et al., 2010), которая зависит, прежде всего, от концентрации Q_B-невосстанавливающихся центров ФС II. Время достижения максимального выхода флуоресценции P (F_M) зависит от скорости восстановления ПХ пула и также отражает концентрацию Q_B-невосстанавливающихся центров (Strasser et al., 2010). При действии хромат-ионов изменялась форма кривой O–J–I–P и наблюдалось снижение вклада фотохимической фазы J–I–P, что свидетельствует о нарушении потока электронов (ϕ_{Eo}) от ФС II в пул хинонов (табл. 1) (Lazár, Schansker, 2009). Квантовый выход электронного транспорта в ФС II (ϕ_{Eo}) у клеток в присутствии хромат-ионов снижен. То есть одно из первых мест воздействия соединений шестивалентного хрома локализовано на акцепторной части ФС II. Это находится в согласии с работой (Prasad et al., 1991), где в опытах с добавлением экзогенного донора электронов ФС II и 2,6-дихлорфенолиндофенола показано повреждение этого участка в присутствии ионов хрома.

Параметр PI_{ABS} является показателем функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии (*ABS*). Этот параметр имеет более высокие показатели у контрольных клеток по сравнению с клетками в присутствии хромат-ионов. Низкие показатели параметра PI_{ABS} (индекс производительности) у обработанных хромат-ионами водорослей указывают на низкую функциональную активность ФС II, в основном из-за снижения доли активных РЦ и повышения тушения возбужденных состояний в антенне. Уменьшение эффективности передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на РЦ должно сопровождаться увеличением рассеивания неиспользуемой световой энергии. Действительно, эффективность рассеивания энергии (DI_0/RC) у клеток в присутствии хромат-ионов находится на высоком уровне. Это коррелирует с увеличением у них ΔpH-зависимого нефотохимического тушения q_E, которое рассчитывается по спаду флуоресценции после достижения максимума ($q_E = (F_M - F_{6s})/F_V$). Увеличение нефотохимического тушения отмечено и при регистрации методом PAM флуорометрии у зеленых пресноводных водорослей в работе (Khalida et al., 2012).

Параметр *ABS/RC* у клеток в присутствии хромат-ионов увеличен относительно контроля, что связано со снижением у них доли активных РЦ. В работе с *Lemna gibba* также было продемонстрировано увеличение размеров антенны на РЦ в присутствии хромат-ионов, которое связали с нарушением биосинтеза белка D1 (Ali et al., 2006).

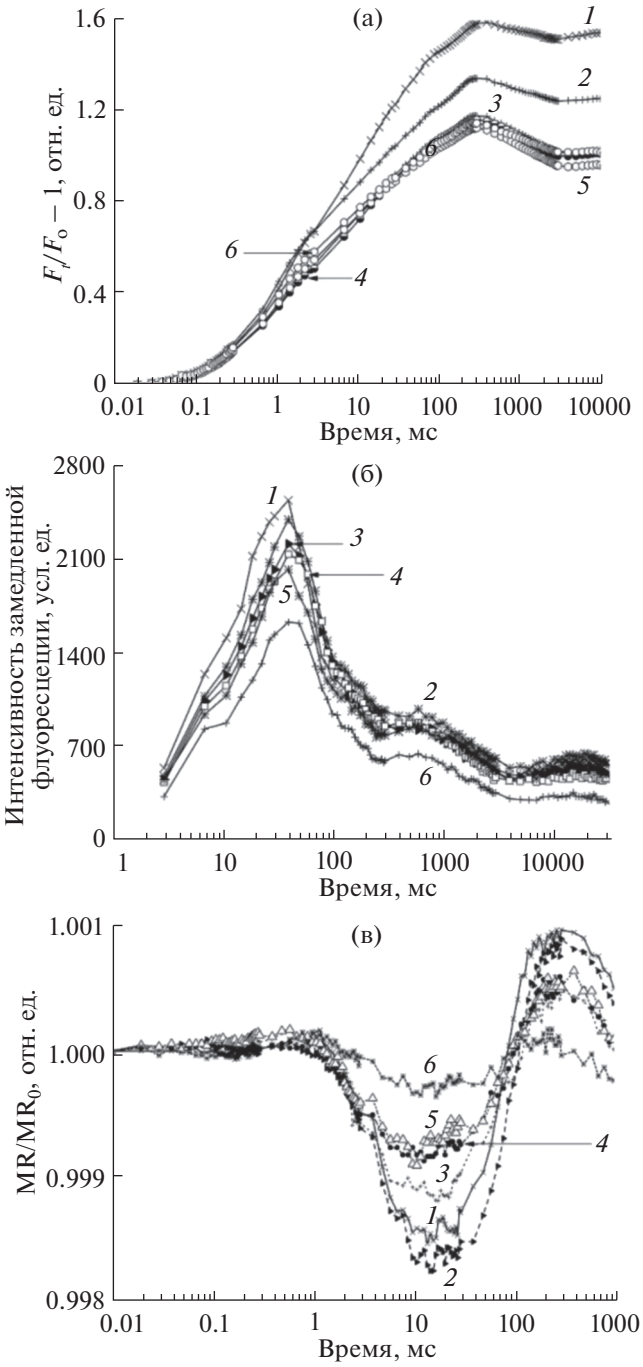

Рис. 3. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (а), замедленной флуоресценции (б) и изменение в отражении при длине волны 820 нм (в) у клеток микроводорослей *P. tricornutum* при различных концентрациях $K_2Cr_2O_7$: *1* – контроль, *2–6* – клетки, инкубированные в течение 24 ч в присутствии $K_2Cr_2O_7$ (2.5; 5; 10; 15; 25 мг/л соответственно). Быстрая флуоресценция нормирована на F_0. Интенсивность действующего красного света 1300 мкЕ/(м^2 с). Одновременные измерения всех трех сигналов выполнены на приборе M-PEA-2.

Для тяжелых металлов отмечалось влияние на донорную часть ФС II (Kumar et al., 2014). На ряске показано, что соли хрома могут влиять на кис-

лород-выделяющий комплекс (КВК) (Ali et al., 2006). В наших экспериментах снижение параметра F_V/F_O, отвечающего за изменения в эффективности расщепления воды в ФС II (при концентрациях 15 и 25 мг/л), также указывает на возможность воздействия соединений хрома на этом участке КВК.

Ранее отмечалось, что в условиях стресса, вызванного различными причинами (Lazar, Schansker, 2009; Strasser et al., 2010; Гольцев и соавт., 2014), на кривых флуоресценции (примерно на 300 мкс) наблюдается появление дополнительного пика K. Этот K-пик связывают с нарушениями на донорной стороне ФС II, и он проявляется при вычитании контрольных кривых из кривых с разрушенным КВК при действии загрязнений. В присутствии хромат-ионов на кривой флуоресценции также обнаруживается K-пик, описываемый параметром V_k (табл. 1), который указывает на нарушения в процессе разложения воды. Ингибирование КВК может также влиять на транспорт электронов ФС II.

Измерения таких величин как F_V/F_M (максимальный квантовый выход ФС II) и PI_{ABS} (индекс производительности) показателей функциональной активности ФС II показали, что хромат-ионы вызвали инактивацию ФС II, и это согласуется с данными об их токсическом действии на ФС II, полученными ранее для других фотосинтетических объектов (Hörcsik et al., 2007; Didur et al., 2013).

Миллисекундная ЗФ возникает в результате вторичной реакции рекомбинации, а ее интенсивность зависит от величины электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране, энергия которого снижает энергию активации реакции обратной рекомбинации (Маторин, Рубин, 2012; Oukarroum et al., 2013; Гольцев и соавт., 2014). Поэтому определение параметров ЗФ является одним из методов, который позволяет следить за изменением градиента протонов фотосинтетической мембраны клетки. Максимум на кривой ЗФ в миллисекундном диапазоне совпадает с фазой возрастания J на индукционной кривой быстрой флуоресценции (рис. 3а). Образование этого пика обусловлено накоплением излучательных редокс-состояний, отвечающих за обратную рекомбинацию зарядов и испускание квантов ЗФ (т.е. высвечивающие состояния), а также усилением ЗФ за счет образующегося электрического потенциала на мембране ($\Delta\psi$). Пик ЗФ в секундном диапазоне связывают с фотоиндуцированным образованием трансмембранного градиента протонов (ΔpH), который также снижает энергию активации излучательных переходов (испускание ЗФ) в РЦ ФС II. Эти закономерности рассмотрены во многих работах (Гольцев и соавт. 2014; Oukarroum et al., 2013).

У клеток в присутствии хромат-ионов значительно снижена интенсивность ЗФ на индукционной кривой при 10–50 мс и 1 с (рис. 3б), что, вероятно, связано со значительным уменьшением нециклического транспорта и, соответственно, уменьшением энергизации фотосинтетических мембран.

Измерение модулированного отражения при 820 нм позволяет следить за реакциями P_{700} (РЦ ФС I). Максимум накопления P_{700}^+ наблюдался при $t \approx 30$ мс (MR_{min}), который потом сменялся восстановлением P_{700} (рис. 3в). При этом сигналы флуоресценции, отражающие восстановление Q_A, и процессы восстановления P_{700} выходят на плато примерно синхронно. Параллельное накопление восстановленных форм P_{700} и Q_A отражает восстановление переносчиков на всем участке ЭТЦ между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФС I в условиях, когда ферредоксин-НАДФ-редуктаза (ФНР) инактивирована инкубацией в темноте. При длительном освещении (~1–10 с) наблюдали вторую волну окисления P_{700}, которую можно объяснить оттоком электронов от ФС I при активации ФНР и ферментов цикла Кальвина.

Как видно из рис. 3в, водоросли при обработке низкими концентрациями хромат-ионов сохраняют способность P_{700} к окислению при включении света. Однако у них наблюдалось снижение скорости восстановления P_{700} от ФС II. Это согласуется с данными анализа индукционных кривых быстрой флуоресценции. При больших концентрациях наблюдается существенное подавление реакций окисления P_{700} в ФС.

Для более детального изучения влияния хромат-ионов на реакции ФС I исследовали кинетику темнового восстановления P_{700}^+ после освещения дальним красным светом (см. Материалы и методы). Во время 20 мс освещения культуры водорослей актиничным светом с длиной волны 700 нм происходило накопление сигнала P_{700}^+. Присутствие хромат-ионов в низкой концентрации (до 5 мг/л) не влияло на накопление сигнала P_{700}^+ (табл. 2). Хромат-ионы уменьшали амплитуду окисления P_{700}^+ только при концентрациях выше 5 мг/л.

После выключения света происходило темновое восстановление P_{700}^+ (рис. 4). У необработанной культуры восстановление P_{700}^+ осуществляется за счет притока электронов от ФС II, а также за счет дополнительных источников от циклического транспорта электронов и стромальных доноров (Wodala et al., 2012). Кинетические кривые восстановления P_{700}^+ у водорослей нами были разло-

Таблица 2. Изменения амплитуды P^+_{700} при освещении в течение 20 мс (5000 мкЕ/(м^2 с)) и амплитуд быстрой и медленной компонент темнового восстановления P_{700} у микроводорослей *P. tricornutum* при действии $K_2Cr_2O_7$ в различных концентрациях через 24 ч инкубации, % от контроля

Концентрация $K_2Cr_2O_7$, мг/л	Начальная амплитуда P^+_{700} после освещения	Быстрая компонента	Медленная компонента
Контроль	100	100	0
2.5	108	90	10
5	87	89	11
10	88	87	13
15	87	76	24
25	70	67	33

жены на две компоненты экспоненты: быструю компоненту восстановления P^+_{700} со временами около 0.5 мс, которая отражает донорство от пластоцианина в нециклическом транспорте (Hope, 2000), и более медленную компоненту восстановления P^+_{700} с временной константой – 15 мс. Вторая компонента может отражать восстановление P^+_{700} как от нециклического, так от циклического электронного транспорта (Hope, 2000; Solovchenko et al., 2015).

В присутствии хромат-ионов происходило снижение скорости восстановления P^+_{700} после выключения света, что согласуется с ранее полученными данными по скорости восстановления P^+_{700} на M-PEA-2. Из рис. 4 и табл. 2 видно, что происходило относительное снижение амплитуды быстрой фазы восстановления сигнала P^+_{700}, что в свою очередь указывает на уменьшение потока электронов от ФС II к P^+_{700}. Примечательно, что амплитуда медленной фазы с увеличением концентрации бихромата калия повышалась, и это, возможно, свидетельствует об увеличении скорости циклического электронного транспорта, что характерно для ответа на действия многих стресс-факторов (Solovchenko et al., 2015). Возможно, вклад вносит и очень медленная фаза, которая представляет электронный поток к ФС I от стромальных доноров. Ранее подобный эффект был описан при действии меди на листья гороха (Wodala et al., 2012).

Известно, что при действии повышенных интенсивностей света могут развиваться процессы фотоингибирования фотосинтеза, и происходит включение защитных процессов безызлучательной диссипации избыточной световой энергии. Как было показано в работе (Chow, Aro, 2005), фотоингибирование фотосинтеза связано, в основном, с распадом D1-белка, который кодируется геномом хлоропласта и является одним из основных компонент ФС II. Восстановление активности ФС II сопровождается ресинтезом этого белка в хлоропласте. Очевидно, что концентрация активных центров ФС I в клетках зависит от соотношения скоростей ее фотоокислительной деструкции и репарации, которые могут быть определены по снижению величины F_V/F_M на интенсивном свету и ее последующего восстановления в темноте, соответственно (Vavilin et al., 1995; Pätsikkä et al., 1998). Фотоингибирование фотосинтеза, связанное с развитием фотоокислительного стресса в клетках, подвергнутых интенсивному освещению, может усиливаться при действии неблагоприятных факторов различной природы, в том числе при токсическом воздействии тяжелых металлов (Vavilin et al., 1995; Chow, Aro, 2005).

На рис. 5 показаны изменения величины F_V/F_M в культуре *P. tricornutum* при повышенной освещенности и последующей темновой экспози-

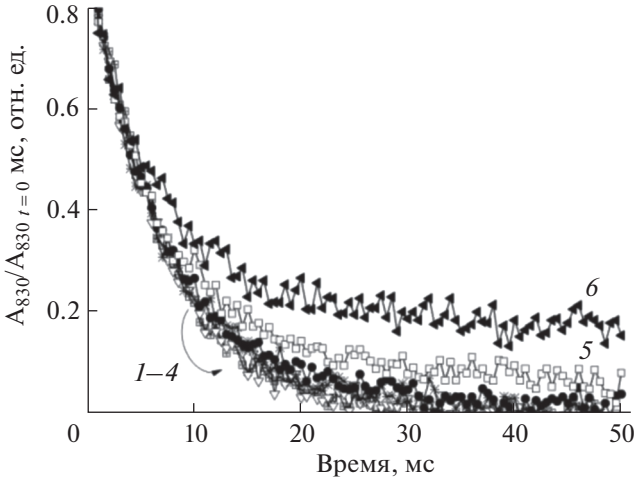

Рис. 4. Влияние $K_2Cr_2O_7$ на кинетику темнового восстановления P^+_{700} после освещение 20 мс (5000 мкЕ/(м^2 с)) у микроводорослей *P. tricornutum*: *1* – контроль, *2–6* – клетки, инкубированные в течение 24 ч в присутствии $K_2Cr_2O_7$ (2.5; 5; 10; 15; 25 мг/л соответственно).

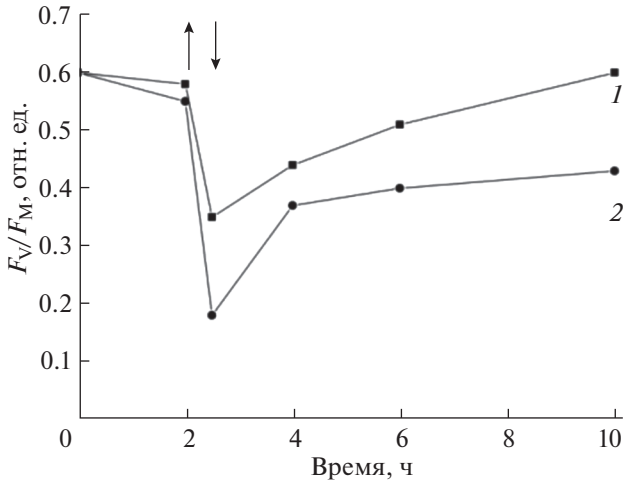

Рис. 5. Изменения величины F_V/F_M в клетках суспензии *P. tricornutum* при экспонировании 25 мин на интенсивном свету (500 мкЕ/(м^2 с)) и в последующий темновой период: *1* – контрольный образец, *2* – клетки инкубировали в присутствии $K_2Cr_2O_7$ (5 мг/л). Интенсивный свет включали через 20 мин после добавления солей хрома. Стрелками вверх и вниз показаны моменты включения и выключения света соответственно.

ции клеток. Как видно из рис. 5, в образцах, обработанных хромат-ионами в низких концентрациях, значительно усиливалось фотоингибирование и замедлялась скорость темнового восстановления величины F_V/F_M по сравнению с контролем. Этот результат свидетельствует о возможном подавлении хромат-ионами процесса репарации фотоповрежденных центров ФС II в клетках водорослей. Уменьшение величины F_V/F_M в присутствии хромат-ионов, вероятно, связано с их влиянием на биосинтез белка D1. В работе с ряской *Lemna gibba* (Ali et al., 2006) было прямо продемонстрировано уменьшение белка D1 в присутствии хромат-ионов. Последнее может играть существенную роль в снижении фотосинтетической активности клеток при действии низких концентраций ионов этих металлов в условиях фотоокислительного стресса. В этой же работе (Ali et al., 2006) на ряске показано, что соли шестивалентного хрома генерируют появление активных форм кислорода, разрушающих липиды тилакоидов, что и ведет к деструкции мембран и повреждению структуры белково-протеинового комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные показали, что хромат-ионы могут сильно ингибировать скорость роста морских микроводорослей P. tricornutum. Обнаруженная корреляция между измерениями численности клеток микроводорослей по параметру флуоресценции FO и прямым измерением количества клеток подтверждает перспективность использования метода флуоресценции при биотестировании вместо длительного и трудоемкого процесса подсчета клеток под микроскопом.

Одновременная регистрация индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния P_{700} на приборе M-PEA-2 позволили выявить первичные стадии воздействия хромат-ионов на реакции фотосинтеза у морских водорослей. Анализ индукционных кривых показал, что одно из первых мест воздействия соединений шестивалентного хрома локализовано на акцепторной части ФС II между Q_A и Q_B. Уменьшение квантового выхода электронного транспорта в ФС II приводит к ингибированию значения индекса производительности (PI_{ABS}).Этот параметр оказался более чувствительным по сравнению с F_V/F_M и может быть рекомендован для биотестирования.

Уменьшение количества активных РЦ и изменение электронного транспорта естественно приводят к нарастанию нефотохимических потерь, связанных с увеличением квантовой эффективности рассеивания энергии (DI_0/RC) и ΔpH-зависимого нефотохимического тушения (q_E).

При анализе редокс-состояния P_{700} (ФС I) обнаружено, что реакции окисления P_{700} у морских водорослей менее чувствительны к соединениям шестивалентного хрома. При этом анализ кинетики темнового восстановления P_{700} показал, что ингибируется быстрая фаза донорства электронов от пластоцианина и ФС II. При этом увеличивается медленная фаза, связанная с циклическим транспортом электронов и стромальных акцепторов. Отмечено влияние на донорную часть ФС II при высоких концентрациях хроматов, что также указывает на возможность воздействия соединений шестивалентного хрома на этом участке КВК.

Показано усиление у *P. tricornutum* в присутствии хромат-ионов фотоингибирования и замедление реакций восстановления в темноте после прекращения фотоокислительного стресса, что подтверждает вероятное влияние хромат-ионов на биосинтез D1-белка РЦ ФС II.

Таким образом, данные настоящей работы показывают, что изменение индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции является одним из первых быстро регистрируемых параметров клеток микроводоросли после действия соединений шестивалентного хрома. Эти параметры могут быть весьма эффективно применены для диагностики состояния исследуемых объектов. Параметры могут быть полезны для использования флуоресценции хлорофилла микроводорослей в биотестировании качества воды в естественных и искусственных водоемах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллахвердиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. М., Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. 220 с.

Заядан Б.К., Маторин Д.Н. Биомониторинг водных экосистем на основе микроводорослей. М.: Изд-во "Альтекс", 2015. 252 с.

Жмур Н.С. Методика определения токсичности водных вытяжек из галитовых отходов и глинисто-солевых шламов, образующихся при производстве калийных удобрений, по снижению темпа роста (снижению численности клеток) и снижению уровня флуоресценции хлорофилла морских водорослей *Phaeodactylum tricornutum*. М.: АКВАРОС, 2016. 36 с.

Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей // М., Ижевск: ИКИ-РХД, 2012. 256 с.

Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты // Учебно-методическое пособие. М.: Альтрекс, 2012. 131 с.

Ali A.N., Dewez D., Didur O., Popovic R. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex // Photosynthesis Res. 2006. V. 89. P. 81–87.

Appenroth K.J., Stöckel J., Srivastava A., Strasser R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements // Environ. Pollut. 2001. V. 115. P. 49–64.

Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J. Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished ΔpH and Δφ components of the proton motive force // J. Bioenerg. Biomembr. 2013. V. 45. P. 37–45.

Chow W.S., Aro E.M. Photoinactivation and mechanisms of recovery // Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase / Eds. Wydrzynski T., Satoh K. Springer, 2005. P. 627–648.

Didur O., Dewez D., Popovic R. Alteration of chromium effect on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures under different synchronized state of the cell cycle // Environ. Sci. Pollut. Res. 2013. V. 20. P. 1870–1875.

Falkowski P.G., Raven J.A. Aquatic Photosynthesis. Malden, Massachusetts: Blackwell Science, 1997. 375 p.

Giloni-Lima P.C., Delello D., Cremonez M.L., Éler M.N., Lima V.A., Espíndola E.L. A study of the effects of chromium exposure on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) hindak evaluated by central composite design and response surface methodology // Ecotoxicology. 2010. V. 19. P. 1095–1101.

Hope A. Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms // Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenerg. 2000. V. 1456. P. 5–26.

Hörcsik Z.T., Kovács L., Láposi R., Mészáros I., Lakatos G., Garab G. Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa* // Photosynthetica. 2007. V. 45. P. 65–69.

Khalida Z., Youcef A., Zitouni B. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the effect of chromium on activity photosystem II at the alga *Scenedesmus obliquus* // Int. J. Res. Rev. Appl. Sci. 2012. V. 12. P. 304–314.

Kumar K.S., Dahms H.U., Lee J.S., Kim H.C., Lee W.C., Shin K.H. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2014. V. 104. P. 51–71.

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

Matorin D., Antal T., Ostrowska M., Rubin A., Ficek D., Majchrowski R. Chlorophyll fluorimetry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // Oceanologia. 2004. V. 46. № 4. P. 519–531.

Oukarroum A., Goltsev V., Strasser R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection // PloS One. 2013. V. 8. № 3. P. 1–10.

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

Prasad S.M., Singh J.B., Rai L.C., Kumar H.D. Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 82. P. 95–100.

Rodríguez M.C., Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Conforti V., Gualtieri P. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Environ. Res. 2007. V. 105. P. 234–239.

Rai V., Vajpayee P., Singh S.N., Mehrotra S. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. // Plant Sci. 2004. V. 167. P. 1159–1169.

Rocchetta I., Küpper H. Chromium-and copper-induced inhibition of photosynthesis in *Euglena gracilis* analysed on the single-cell level by fluorescence kinetic microscopy // New Phytologist. 2009. V. 182. P. 405–420.

Solovchenko A., Gorelova O., Selyakh I., Pogosyan S., Baulina O., Semenova L., Lobakova E. A novel CO_2-tolerant symbiotic *Desmodesmus* (*Chlorophyceae, Desmodesmaceae*): Acclimation to and performance at a high carbon dioxide level // Algal Res. 2015. V. 11. P. 399–410.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1797. P. 1313–1326.

Susplugas S., Srivastava A., Strasser R.J. Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrhiza*: effect of chromate // J. Plant Physiol. 2000. V. 157. P. 503–512.

Vajpayee P., Rai U.N., Ali M.B., Tripathi R.D., Yadav V., Sinha S., Singh S.N. Chromium-induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent // Bull. Environ. Contaminat. Toxicol. 2001. V. 67. P. 246–256.

Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // J. Plant Physiol. 1995. V. 146. P. 609–614.

Wodala B., Eitel G., Gyula T.N., Ördög A., Horváth F. Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P_{700} absorbance in pea leaves // Photosynthetica. 2012. V. 50. P. 380–386.

Effect of Chromate Ions on Marine Microalgae *Phaeodactylum tricornutum*

D. T. Gabbasova[1], D. N. Matorin[1, *], I. V. Konyukhov[1], N. Kh. Seifullina[1], and B. K. Zayadan[2]

[1]*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

[2]*Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan*

**e-mail: matorin@biophys.msu.ru*

Received July 28, 2016

Abstract—Effect of chromate ions on the culture of a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* was studied using an M-REA-2 fluorimeter, which carries out simultaneous measurement of fluorescence induction and redox transfromations of the P_{700} pigment within a millisecond range. Chromate ions were shown to inhibit electron transport in PSII and decreare the rate of Q_A reduction. This results in decreased values of the quantum yield of electron transport in PSII (φ_{Eo}) and performance index (PI_{ABS}), lower rates of P_{700} reduction, and increased energy (DI_0/RC) and ΔpH-dependent nonphotochemical quenching (q_E). Emergence of the slow component of P_{700} reduction was observed, indicating the activation of cyclic transport in the presence of chromate. Performance index (PI_{ABS}), which was the most sensitive parameter, may be recommended for detection of chromate ions at early stages of their toxic action. The fluorescence parameter F_O is promising application in biotesting to assess the algal growth rates.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, chrome ions, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biotesting, JIP test, M-REA-2