

На правах рукописи

Фомина Ирина Алексеевна

**МОНИТОРИНГ КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ
ПО СОСТОЯНИЮ ПОПУЛЯЦИИ
ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.02.10 – гидробиология,

03.02.08 - экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена на кафедрах биоинженерии и гидробиологии
Биологического факультета Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Лобакова Елена Сергеевна

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор кафедры гидробиологии
биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова

Филенко Олег Федорович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор кафедры органической химии,
заведующий лабораторией физической органической химии химического
факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Петросян Валерий Самсонович

доктор географических наук, ведущий научный сотрудник отдела
управления водными ресурсами Институт водных проблем Российской
академии наук

Разумовский Лев Владимирович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории
сводного прогноза ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
институт рыбного хозяйства и океанографии»

Семеняк Людмила Васильевна

Защита состоится « » 2018 г. в ... час. ... мин. на заседании
диссертационного совета МГУ.03.03 при Московском государственном
университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ, ауд. 389.
тел: 8 (495) 939-25-73; эл. почта: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке МГУ
и на сайте <http://www.bio.msu.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Вода является одним из важнейших экономических ресурсов России. Водотоки (реки, ручьи, каналы) представляют собой объекты, характеризующиеся высокой степенью пространственной и временной неоднородности как по гидролого-гидрохимическим характеристикам, так и по гидробиологическим параметрам (Водный кодекс Российской Федерации, 2006). Известно, что система контроля качества водной среды на всей территории России основана на дифференцированном определении концентрации загрязняющих веществ и сопоставлении их с предельно допустимыми концентрациями (ПДК) (Шлычкова и др., 1992; Юрин, 2001). Превышение ПДК служит основанием для оценки состояния среды, как неблагоприятного. Основное назначение ПДК – обеспечивать критерий для установления пределов допустимого воздействия на водные объекты 1) до начала загрязнения с целью предотвращения экологических нарушений, 2) для оценки превышения допустимого воздействия после его начала для своевременного принятия необходимых природоохранных мер (Нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения, 2011).

Токсикологическая характеристика водной среды вблизи источников загрязнения и экологическое состояние конкретных водных объектов оцениваются методами токсикологического контроля и биоиндикации. Основным методом токсикологического контроля является биотестирование. Биотестированием обычно называют методический прием оценки качества окружающей среды по реакциям или поддающимся учету характеристикам организмов, находящихся в этой среде (Филенко, 2007). Тест-объект выступает в роли прибора, выявляющего интегральный биологический эффект комплекса неблагоприятных экологических факторов, в том числе и химической природы. К числу преимуществ биотестирования относятся оперативность и чувствительность. В последние десятилетия понятие биотестирования чаще всего используют в связи с токсикологическим контролем сред с неопределенным или сложным составом, куда включаются сточные и загрязненные природные воды. Результаты биотестирования, которые выражаются в сроке наступления изменений у тест-объекта могут служить основанием для проведения оперативных мер по снижению загрязнения водной среды (Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов, 2002).

Оперативные свидетельства неблагоприятного действия окружающей среды могут быть получены при оценках структурно-функционального состояния клеток, находящихся

в загрязняемой среде. Фитопланктонное микробное сообщество можно рассматривать как биоиндикатор, реагирующий на изменения физико-химических параметров водной среды посредством изменения функционального состояния клеток. Активность отдельно взятой однородной популяции можно охарактеризовать с помощью ИК-спектроскопии внутреннего отражения путем регистрации преимущественной пространственной ориентации определенных химических связей в макромолекулярных комплексах целых клеток и их внешних структур при различных направлениях поляризации светового потока (Королев, 1999; Хромов и др., 2013, Даллакян, 2013). В качестве биоиндикатора могут быть использованы фотосинтезирующие микроорганизмы, различающиеся по морфологическим и физиологическим особенностям (цианобактерии и зеленые микроводоросли), растущие в диффузионной культуре.

Цель и задачи исследования. Исследовать структурные изменения клеточных белков в популяции клеток фототрофных микроорганизмов (цианобактерий и микроводорослей) при различных внешних воздействиях посредством ИК-спектроскопии внутреннего отражения и оценить возможность использования данного подхода для контроля качества водной среды.

Для достижения цели были поставлены следующие основные **задачи**:

1. Оценить возможность применения метода спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне для оценки состояния клеток в популяциях фототрофных микроорганизмов по разности дихроичных отношений полос поглощения белков целых клеток и их внешних структур.
2. Выбрать спектральный показатель, способный характеризовать общее состояние популяции клеток фототрофных микроорганизмов на примере цианобактерий рода *Synechococcus* в зависимости от условий культивирования.
3. Установить зависимость изменения выбранного показателя от концентрации клеток в популяции, объема среды, длительности инкубации в исследуемой среде, от гидрохимического состава среды.
4. Предложить методику применения спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне клеток цианобактерий для оценки качества водной среды в лабораторных условиях и для контроля загрязнения природного водоема *in situ* в процессе экологического мониторинга.

Научная новизна. Впервые предложен подход, основанный на спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне, дающий возможность по разности дихроичных отношений полос поглощения белков клеток фототрофных микроорганизмов и их

внешних структур (ΔP) оценить состояние популяции в зависимости от условий культивирования.

Впервые предложено использовать показатель ΔP , позволяющий оценивать физиологическое состояние клеток микроорганизмов по интегральным структурным изменениям, для оценки загрязнений водной среды. Дано объяснение причин изменения спектральных характеристик культуры в ИК-диапазоне при различных внешних воздействиях.

Установлено, что выбранный показатель ΔP для диализных культур фототрофных микроорганизмов зависит от гидрохимического состава водной среды, но не от численности клеток в популяции, длительности их инкубации и объема внешней среды.

Впервые проведено сопоставление предложенного показателя с основными гидрохимическими характеристиками водной среды в лабораторных и природных условиях, свидетельствующее об их корреляции и, позволяющее использовать этот подход для разработки перспективных методов экологического контроля.

Впервые установлено, что подобный принцип исследования применим для оценки состояния диализных культур фотосинтезирующих микроорганизмов, различающихся по физиологическим и морфологическим особенностям.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые разработана и применена на практике модификация методики использования диализных культур цианобактерий для оценки качества среды и экологического мониторинга. Доказано изменение величины показателя ΔP диализных культур в зависимости от уровня загрязнения водной среды в условиях реального водного объекта. Определены перспективы применения разработанного методического подхода для биотестирования качества водной среды в лабораторных условиях и в экологическом мониторинге.

Ряд положений данной работы использован в курсе лекций «Методы неинвазивного анализа», а также в лабораторном практикуме (разделы: «Культивирование фототрофных и гетеротрофных микроорганизмов»; «Устойчивость цианобактерий и гетеротрофных бактерий к действию тяжелых металлов и других факторов среды»).

Личный вклад соискателя. Выбор и обоснование научной тематики исследования, получение результатов, их анализ и интерпретация сделаны при решающем участии автора. Все эксперименты и полевые наблюдения получены самостоятельно автором или при его непосредственном активном участии. Автор освоил методы обработки и анализа данных, провел анализ полученных результатов с применением критериев параметрической и непараметрической статистики, обобщил и представил полученный материал, сформулировал выводы. Опубликованные работы написаны автором лично, а также при

участии научного руководителя и других коллег. Текст диссертации написан автором по плану, согласованному с научным руководителем.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стрессовые воздействия на популяции фотосинтезирующих микроорганизмов вызывают структурную перестройку клеток, сопровождающуюся, в том числе, переориентацией белковых молекул, которая может быть выявлена с применением метода спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне.
2. Предложенный показатель ΔP (разность дихроичных отношений полос поглощения белков клеток фототрофных микроорганизмов и их внешних структур) отражает происходящие перестройки и может служить диагностическим признаком состояния клеточной популяции фотосинтезирующих микроорганизмов.
3. Величина ΔP меняется с изменением гидрохимического состава водной среды и может характеризовать уровень ее загрязненности.
4. Предложенный метод оценки состояния популяции фотосинтезирующих микроорганизмов по величине ΔP пригоден для использования при оценках качества воды в лабораторных исследованиях и в условиях *in situ* при экологическом мониторинге, как это показано на примере обследования двух пунктов на реке Москва.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на: научных семинарах кафедр гидробиологии и биоинженерии биологического факультета МГУ; научных конференциях: XI Международная научно-техническая конференция «Оптические методы исследования потоков», Москва, 2011; Международная научно-практическая интернет-конференция «Генетико-биохимические аспекты современной биологии клетки». Саранск, 2011, Мордовский гос. ун-т им. Н.П. Огарева; Международная конференция «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред», Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, 2013; Международная научная конференция «Физиология и биотехнология окислительных фотоавтотрофных микроорганизмов: взгляд в будущее», Москва, 2014. МГУ имени М.В. Ломоносова; XXV и XXVI Международная конференция и дискуссионный научный клуб. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2015; 2016.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы. Из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК, входящих в международные базы данных, а также 12 материалов и тезисов конференций. Список литературы, приведенный в автореферате, включает, в том числе 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6-ти глав, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 167 источников из которых 57 – на иностранных языках. Общий объем диссертации - 122 страницы. Диссертация включает 10 таблиц и 15 рисунков.

Благодарности. Автор приносит глубокую благодарность за чуткое руководство и огромную помощь в ходе выполнения работы и подготовки диссертации научному руководителю работы – профессору кафедры биоинженерии, д.б.н. Лобаковой Елене Сергеевне, д. б. н., профессору Филенко Олегу Федоровичу, кандидату технических наук Панченко Ларисе Андреевне, доктору биологических наук Королеву Юрию Николаевичу.

Благодарю всех моих друзей и коллег за поддержку и внимание к данной работе, за помощь в проведении экспериментов, ценные советы; благодарю всех принимавших участие в обсуждении отдельных затронутых в работе вопросов и помогавших в их решении.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

I. Обзор литературы состоит из трех глав

1. Современный взгляд на проблемы экологического контроля

В главе приводится информация по системе экологического контроля на территории России, основанной на дифференцированном определении концентрации загрязняющих веществ и сопоставлении их с ПДК. Установлено около 1700 ПДК вредных веществ для водных объектов, тогда как число загрязняющих веществ антропогенного происхождения в диапазоне концентраций ($10^{-4} - 10^{-7}$) % в водоемах и водотоках превышает в настоящее время миллион наименований. При этом не более 10 % от общего числа нормированных вредных веществ обеспечено методами анализа на уровне ПДК. Затронуты темы взаимодействия и превращения загрязняющих веществ в сложные комплексные соединения, которые могут быть токсичнее исходных компонентов и/или обладать мутагенным эффектом. Рассматривается необходимость дополнения норм ПДК в системе мониторинга поверхностных пресных вод биологическими методами, позволяющими получить информацию о совокупном воздействии как контролируемых, так и неконтролируемых загрязнителей (Булгаков и др., 2002; Филенко, 2007; Мелехова и др., 2010; Горбатов и др., 2013; Котелевцев и др., 2015; Ermakov, Gorshkova, 2013). Описываются основные направления биологического контроля загрязнений окружающей среды биоиндикация и биотестирование (Хазанова и др., 2012; Терехова и др., 2014; Kahru et al., 2005;).

2. Условия культивирования биоиндикатора, необходимые для оценки качества водной среды

В главе суммированы данные о степени пространственной и временной изменчивости структурных характеристик (численность, биомасса, видовое разнообразие) фитопланктонного сообщества. Приводятся данные о наиболее часто используемых в биотестировании и биоиндикации тест-организмах (Бухарин, Немцева, 2008; Ипатова и др., 2011; 2013; Хунджуа и др., 2013; Шавырина, Гапочка, 2013; Дмитриева и др., 2014; Ипатова, Михеев, 2015). Рассматриваются подходы контроля загрязнения природного водотока *in situ* с использованием иммобилизации клеток фототрофных микроорганизмов в (или на) носителе (Саванина и др., 2008; Лебедева и др., 2010; Васильева и др., 2016).

3. Определение состояния культуры микроорганизмов по степени пространственной организации целых клеток и их внешних структур

Затронуты темы изменения среды обитания и реакций живых систем на них. Обсуждаются неинвазивные методы исследования реакций клеток различных организмов на факторы воздействия, обеспечивающие получение информации о степени упорядоченности живых структур без их разрушения (Абакумов, 1991; Асланян и др., 2011; Даллакян, Агеева, 2015).

Установлено, что методическая база исследований нативных клеток должна включать получение информации об изменении во времени химического состава объекта на разном расстоянии от его поверхности и степени организации биополимеров в пространстве. А также использовать статистические методы анализа и синтеза, поскольку реальные объекты, как правило, носят случайный, а не детерминированный характер. Оптические методы (включая спектральные) используются, в частности, при оценке роста культур микроорганизмов (Щеголькова и др., 2011; Соловченко и др., 2013 а; Saleh et al., 2014), и их физиологического состояния (Соловченко и др., 2011; 2013б; Ипатова и др., 2013). Наиболее полно перечисленным выше требованиям отвечают методы спектроскопии полного внутреннего отражения (Харрик, 1970).

II. Объекты и методы исследования

В качестве тест-объектов для оценки состояния водной среды использовали культуры: 1) свободноживущей одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301 (далее в тексте *Synechococcus* 6301); 2) нитчатой гетероцистообразующей цианобактерии *Anabaena variabilis* ATCC 29413; 3) зеленой микроводоросли *Desmodesmus* sp. штамм 3Dr86E-1, полученных из музея кафедры биоинженерии биологического

факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Культуры цианобактерий выращивали на стандартной среде “С” (Kratz, Maers, 1955) и минимальной среде “С₀” не содержащей микроэлементов и железа и разбавленной по основным компонентам в 3 раза. Культуру зеленой микроводоросли выращивали на среде BG-11 (Stanier et.al., 1971). Опыты проводили в люминастате при температуре 20° С и освещенности 1500 лк при использовании люминесцентных ламп.

Исследуемый материал. В годичном эксперименте использовали пробы вод, отобранные в двух точках реки Москвы: в районе села Каринское выше г. Звенигород и у места впадения р. Истра в р. Москва (г. Дмитровское). Пробы отбирали ежемесячно в течение 2012 г. в соответствии с общепринятыми методами (Шлычева и др., 1992).

Оценивались количественный (суммарная численность особей, биомасса) и видовой состав сообществ фитопланктонных микроорганизмов в пробах, а также показатели загрязнения водоемов. Определение химических соединений – аммония (по азоту), нитратов (фотометрия с салициловой кислотой), сульфатов (осаждением с ионами бария), фосфатов (фотометрия с аскорбиновой кислотой), хлоридов (меркуриметрия) а также содержание органики, определяемое по мутности раствора перманганатным методом (БПК) (ГОСТ 4389-72, МВИ 01.1:1.2.4.12-05, МВИ 01.1:1.2.4.16-05, 01.1:1.4.2:2.18-05 проводили совместно в аналитической лаборатории МГУП Мосводоканал.

Для оценки влияния характера загрязнений (органические или минеральные) исследовали также воду Бутовского пруда (полупроточный зарыбленный водоем в рекреационной зоне) и среду «С» с добавлениями загрязнителей. Для моделирования промышленного и эвтрофикационного загрязнений в среду «С» вносились, соответственно, 10 мг/л $MnCl_2$ и 0,4 г/л K_2HPO_4 .

Подготовка культур к исследованиям. 7-9-суточные культуры клеток цианобактерий и микроводорослей, находящихся в log-фазе роста помещали в диализные мешки и истощали 2-3 сут. на минимальной среде С₀, после чего переносили в исследуемые пробы воды. Тест-культуры находились в «двойном сосуде»: мешок из полупроницаемой мембраны фирмы Serva, с размерами пор, пропускающими соединения с молекулярной массой до 15 кДа (Лебедева и др., 2009). В полевых экспериментах (летний период 2013 г.) диализные мешки в защитных пластиковых чехлах с отверстиями для водообмена размещали на 2 или 5 сут. в точках забора проб; при лабораторных исследованиях проб соблюдались максимально приближенные условия по температуре и освещенности.

Величины pH и E_h среды культивирования определяли с помощью электрометра фирмы Cole-Parmer при перемешивании пробы на магнитной мешалке. Для определения

pH использовали комбинированный стеклянный электрод, для определения E_h среды использовали Pt-электрод, а в качестве электрода сравнения – Ag/AgCl (Барский и др., 1999).

Спектроскопия полного внутреннего отражения в ИК-диапазоне использовалась для оценки функционального состояния клеток (Харрик, 1970; Барский и др., 2010). Клеточную суспензию осаждали при 6 тыс. об/мин, наносили в виде водной пасты на измерительный элемент ИК-спектрофотометра ИКС-29 и подсушивали (для измерений в ИК-диапазоне требуется максимально удалить воду). Метод позволяет оценить количество и пространственное распределение в клетках основных молекул: липидов, белков, нуклеиновых кислот и углеводов.

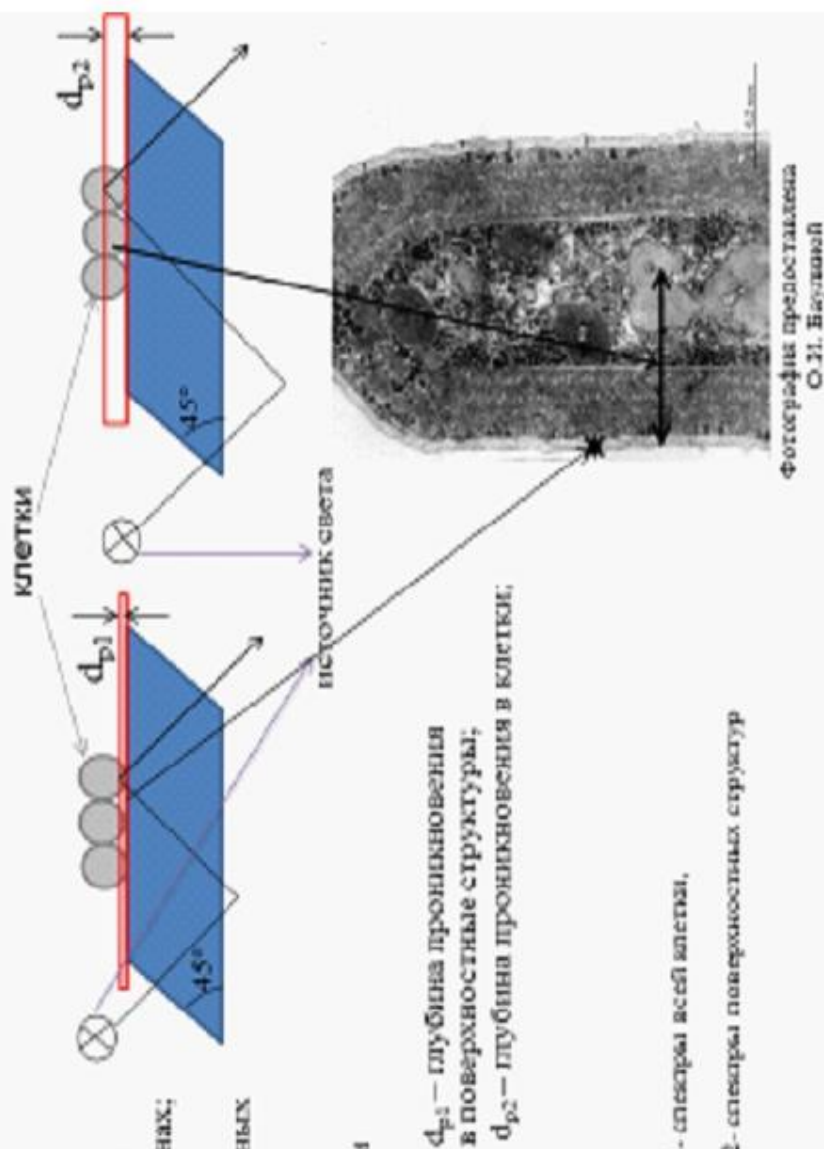
В работе использовали: 1) измерительные элементы из германия; 2) пленочную реплику-поляризатор на основе полиэтилена (1200 штрихов/мм), обладающую степенью поляризации 95-96% и пропусканием 46-48%. Параметры измерительного элемента для внешних структур клеток выбирали, исходя из того, что толщина периферических слоев клеток у различных фототрофных микроорганизмов варьирует в пределах 0,05-0,2 мкм (Королева, 2010).

Экспериментальные данные в виде ИК-спектров (см. Рис. 1) получали в поляризованном свете при азимутах поляризации 0° и 90° с углом падения светового потока на измерительные элементы равным 45° , что позволяет упростить расчет дихроичных отношений, обусловленных соотношением оптических плотностей. параллельной и перпендикулярной компонент плоско поляризованного света ($K = D_{\parallel}/D_{\perp}$, где $D_{\parallel}$ и $D_{\perp}$ - эффективная толщина образца для параллельной и перпендикулярной компонент плоскополяризованного света). K , равное 2, свидетельствует об изотропном состоянии объекта; отклонение от этого значения в любую сторону характеризует степень анизотропии.

Состояние клеток можно определять количественно по пространственной ориентации белковых молекул (упорядоченность), измеряемой в поляризованном свете. Мы обозначили ее как дихроичные отношения (P). В области 1660 см^{-1} и 1550 см^{-1} , принадлежащей белковым компонентам (амид 1 и амид 2, соответственно для альфа-спиралей и бета-слоев белковых молекул), наблюдали наиболее существенные различия между клетками в разных функциональных состояниях, а также между макромолекулярными структурами целой клетки ($P_{\text{кл}}$) и клеточной поверхности ($P_{\text{вн.ст.}}$) (Рис.2). Разность между $P_{\text{кл}}$ и $P_{\text{вн.ст.}}$ обозначим ΔP . Уменьшение величины этой разности, как было показано для ряда микроорганизмов, коррелирует со снижением их физиологической активности (Дуда и

Послойный спектральный анализ клеток методом спектроскопии внутреннего отражения в ИК-области

- Возможность проводить исследование живых организмов в различных диапазонах;
- Анализ многокомпонентных гетерогенных систем *без их разрушения*;
- Послойный анализ клеток на разном расстоянии от поверхности;



d_{p1} – глубина проникновения в поверхностные структуры;
 d_{p2} – глубина проникновения в клетки;

- 1 - спектры всей клетки,
 2 - спектры поверхностных структур

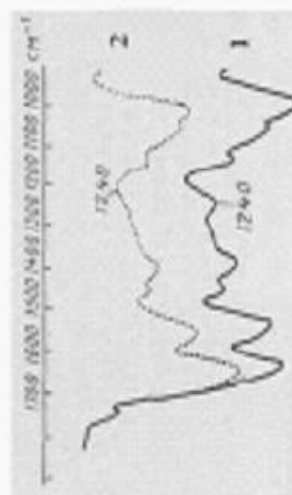


Рис. 1. Метод спектроскопии внутреннего отражения

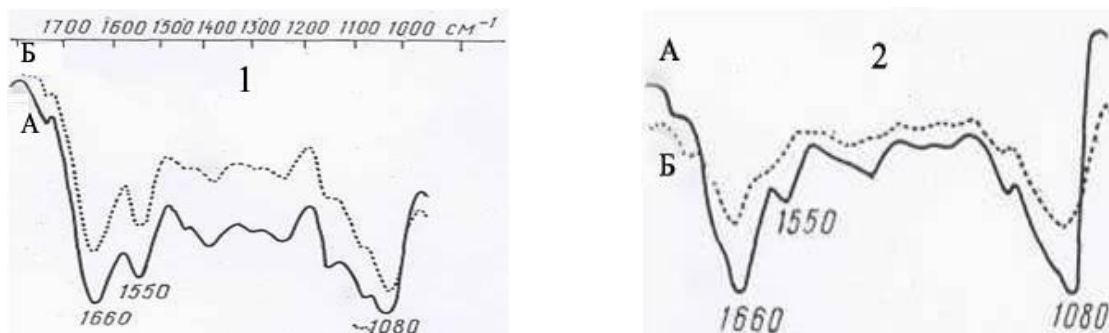


Рис. 2. Дихроичные соотношения для спектральных полос поглощения в ИК-области, полученные в поляризованном свете. 1 – спектры всей клетки; 2 – спектры поверхностных структур клетки. Линии А и Б соответствуют параллельной и перпендикулярной составляющей плоско поляризованного света. Половина диаметра клетки *Synechococcus* 6301 составляет 1,5 мкм, а толщина периферических слоев клетки. – 0,03 мкм.

др., 1978; Калабеков, Королев, 2000). На основании этого мы предположили, что по величине ΔP может быть оценено качество водной среды.

Статистическую обработку экспериментальных данных производили для разных показателей, используя от 3 до 5 повторности каждого эксперимента. Погрешности определения содержания клеток составляли 12-15%, а величин pH, E_h и показателя ΔP не превышали 15%.

Статистический анализ проводился в 2 этапа. На первом этапе проверялась гипотеза о нормальности распределения ΔP для каждой их выборок. Если распределение исходных данных было отлично от нормального, использовались методы дисперсионного анализа (Analysis of Variance, ANOVA) и непараметрические критерии Kruskal-Wallis test, Brown-Mood test. За величину статистической значимости принимали $\alpha=0,05$ (Мятлев и др., 2009; Zar, 2010).

III. Результаты исследования и их обсуждение

1. Изменения показателя ΔP при периодическом и диализном культивировании цианобактерии *Synechococcus* PCC 6301

2.

Проведено сравнение роста цианобактерии *Synechococcus* 6301, на минеральной среде «С» в периодическом суспензионном и периодическом диффузионном (далее в тексте «периодическом» и «диализном» соответственно) режимах культивирования (Рис. 3 кривая 1).

Интенсивность роста и накопление биомассы цианобактерии при диализном культивировании почти в 5 раз выше по сравнению с периодическим, при этом длительность lag-фазы и время перехода культуры от экспоненциальной фазы роста к стационарной приблизительно одинаковы. Установлено, что в обоих режимах культивирования популяция клеток *Synechococcus* 6301 в lag- и log-фазы роста

представлена короткими одиночными клетками (3-4 мкм). В стационарной фазе до 80% периодической культуры представлено удлинёнными клетками (более 5 мкм) и/или короткими цепочками, состоящими из 2-4 кл.; возрастает число мертвых клеток. В диализной культуре, не смотря на высокую концентрацию, в стационарной фазе роста более 90% популяции представлено «молодыми» (3-4 мкм) клетками, мертвые клетки составляют не более 1%.

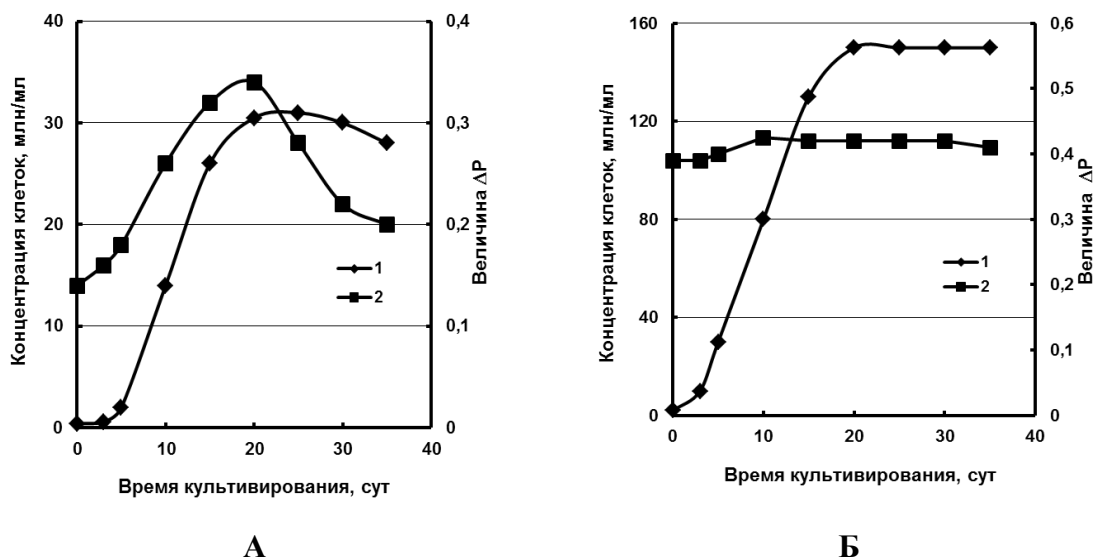


Рис. 3. Рост цианобактерий *Synechococcus* 6301 и величина ΔP при периодическом (А) и диализном (Б) режиме культивирования. 1 и 2 – кривые роста и величина показателя ΔP соответственно. Содержание клеток при засеве составляло 0,3 и 1 млн/мл для А и Б соответственно.

При сравнении значений показателя ΔP диализной и периодической культур *Synechococcus* 6301 (Рис. 3 А, Б, кривая 2) наблюдаются значительные различия. В периодическом режиме культивирования его изменения во многом совпадают с кривой роста и имеют вид S-ной кривой. При отсутствии внешних воздействий значительное увеличение показателя ΔP в течение log-фазы роста периодической культуры (А) может быть обусловлено снижением влияния адаптационного стресса периодической культуры популяции *Synechococcus* 6301 в результате интенсивного роста. Снижение ΔP при переходе периодической культуры в стационарную фазу, скорее всего, связано с накоплением в среде аутоингибиторов роста в результате разрушения части клеток в популяции при истощении субстрата.

В диализном режиме культивирования величина ΔP характеризуется относительной стабильностью. В период lag-фазы это может быть связано с наличием более благоприятных условий для начала роста и развития популяции в локальном объеме, то

есть отсутствии адаптационного стресса пересадки культуры. При равных общих объемах среды культивирования (300 мл в периодической и 250 мл «внешней»+50 мл в мешке в диализной) в диализной культуре клетки инокулята в ограниченном объеме диализного мешка, не испытывают негативного воздействия низкомолекулярных аутоингибиторов и продуктов автолиза клеток, что снижает влияние стресса при адаптации клеток к меняющейся среде (Рис. 3, Б).

При отсутствии внешних воздействий начало роста как в диализной, так и в периодической культуре сопровождается снижением величины окислительно-восстановительного потенциала (E_h) среды от ~350-400 мВ и достигает в начале экспоненциальной фазы роста 220-230 мВ, что может свидетельствовать о существенных физиологических изменениях, происходящих в клетке к началу интенсивного роста. Такое снижение величины E_h среды обусловлено выделением из клеток низкомолекулярных SH-соединений (Барский и др., 1999). С возрастом культур наблюдается увеличение E_h среды. Можно полагать, что снижение E_h среды как внутри клеток, так и в среде культивирования в lag-фазный период развития культур, необходимо для последующего роста клеток и синтеза биологически активных соединений. Увеличение pH среды при круглосуточном освещении диализной и периодической культуры *Synechococcus* 6301 протекает в течение 7-9 сут, заканчивается к концу log-фазы роста и обусловлено накоплением клеточной биомассы в результате фотосинтетических процессов.

Благодаря выделению низкомолекулярных метаболитов во «внешнюю» среду диализной культуры наблюдается стабилизация величины E_h и pH среды культивирования и увеличение продолжительности стационарной фазы. Возможно, по этой причине и величина ΔP диализной культуры практически не изменяется, что имеет существенное значение для нашего подхода к оценке качества водной среды.

В качестве тест-объекта для токсикологических исследований мы выбрали диализную культуру *Synechococcus* 6301 в возрасте 9-11 сут. (при переходе культуры в стационарную фазу). В данном интервале величина ΔP диализной культуры практически не изменяется, рост культуры, изменения E_h и pH среды незначительны, а клетки сохраняют чувствительность к внешним воздействиям и физиологическую активность.

2. Зависимость величины показателя ΔP тест-культуры *Synechococcus* 6301 от уровня загрязнения водной среды

Степень проявления токсического эффекта обусловлена продолжительностью воздействия токсиканта и концентрацией его в клетке. В связи с этим было проверено в

какой мере величина ΔP зависит от уровня загрязнения водной среды и в какой – от таких факторов, как время инкубации культуры на загрязненной среде, начальная концентрация клеток тест-культуры в единице объема, а также вида загрязнителей.

Для оценки влияния уровня загрязнений на физиологические показатели популяции клеток *Synechococcus* 6301 были выбраны 2 точки на реке Москва: у села Каринское выше г. Звенигорода (т. Каринское) и у места впадения реки Истра в реку Москва ниже г. Дмитрова (т. Дмитровское).

Таблица 1. Изменения количества клеток диализной культуры *Synechococcus* 6301, значений величины рН, E_h и ΔP в зависимости от уровня загрязнения водной среды и времени инкубации культуры.

Варианты и условия опыта	Время инкубации 2 сут				Время инкубации 5 сут			
	Кол-во кл/мл	рН	E_h , мВ	ΔP	Кол-во кл/мл	рН	E_h , мВ	ΔP
Контроль, среда “С”	$1,4 \cdot 10^6$	7,8	240	0,32	$3,1 \cdot 10^6$	7,7	210	0,32
Каринское	$1,6 \cdot 10^6$	7,1	380	0,25	$2,5 \cdot 10^6$	7,7	300	0,25
Дмитровское	$1,5 \cdot 10^6$	7,1	370	0,17	$3,0 \cdot 10^6$	7,8	310	0,17
Пруд в Бутово	$1,0 \cdot 10^6$	7,0	400	0,16	$3,3 \cdot 10^6$	8,1	390	0,16
Среда “С” 10 мг/л $MnCl_2$	$1,2 \cdot 10^6$	7,2	225	0,13	$2,0 \cdot 10^6$	7,8	200	0,13
Среда “С” 0,4 г/л K_2HPO_4	$1,2 \cdot 10^6$	7,2	225	0,13	$2,0 \cdot 10^6$	7,8	200	0,13

Примечание: объем пробы (внешней среды) составлял 0,5 л; концентрация клеток при посеве культуры на среде “С” составляла 10^6 кл/мл, а величина рН, E_h и показателя ΔP – 7,2, 350 мВ и 0,32 соответственно.

Данные, представленные в Табл. 1, свидетельствуют о существенных различиях ростовых и физиологических параметров культуры *Synechococcus* 6301, находящейся в различных по содержанию загрязнителей водных средах. Накопление биомассы, величина рН и E_h среды зависят от содержания загрязнителей и времени инкубации культуры.

Количество клеток тест-культуры за время инкубации увеличивается в 2-4 раза, величина рН среды незначительно возрастает; величина E_h среды претерпевает существенные изменения в контроле, в т. «Каринское» и «Дмитровское», а также в присутствии добавленных солей. Показатель ΔP практически не зависит от времени инкубации клеток в интервале от 2 до 5 суток, но реагирует на уровень загрязненности исследуемой среды. Величина ΔP наиболее высока в контроле и в пробе из т. «Каринское», но существенно снижалась для т. «Дмитровское» и особенно для лабораторной среды “С”, содержащей ионы тяжелого металла Mn^{3+} . При этом наблюдается корреляция между величиной ΔP , загрязнением среды и состоянием культуры.

Результаты дисперсионного анализа позволяют сделать вывод, что для диализной культуры цианобактерии *Synechococcus* 6301 значение показателя ΔP зависит главным образом от уровня загрязнения водной среды: т. «Каринское» и т. «Дмитровское» статистически значимо различаются по степени загрязнения. Влияние на показатель ΔP таких факторов, как начальная концентрация клеток тест-культуры, время инкубации культуры на загрязненной среде на уровне значимости $\alpha=0,05$ статистически незначимо. Влияние вида загрязнителей ($MnCl_2$, K_2HPO_4 , органическое загрязнение Бутовского пруда) на ΔP статистически значимо на уровне значимости $p \ll \alpha = 0,05$.

Пробы поверхностных вод из точек Каринское и Дмитровское исследовали в лабораторных условиях в течение года. Величина показателя ΔP популяции клеток *Synechococcus* 6301 для т. Каринское в ноябре - декабре в 1,5-2 раза, а в период с марта по июнь - в 1,5-3 раза выше по сравнению с таковым для точки Дмитровское. Т.е. при равных условиях величина ΔP зависит, главным образом, от загрязненности водной среды (Рис. 4).

При статистической обработке данных для проверки гипотезы о нормальности распределения ΔP использовали критерий согласия Колмогорова-Смирнова. Для каждой из выборок $p > 0,20 > \alpha = 0,05$, т.е. гипотеза о нормальности распределения не отвергается, поэтому для исследования влияния на показатель ΔP каждого из факторов использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Влияние факторов «месяц взятия пробы» и «место взятия пробы», а также влияние взаимодействия факторов на ΔP статистически значимо при $p \ll \alpha = 0,05$. Результаты множественного сравнения (метод Дункана) также показывают, что время и место взятия проб и взаимодействие этих факторов влияют на ΔP , p -значение $< 0,05$. Средние значения ΔP в мае, июне, июле для Каринского и в июле для Дмитровского статистически значимо отличаются друг от друга и от всех других средних значений ΔP .

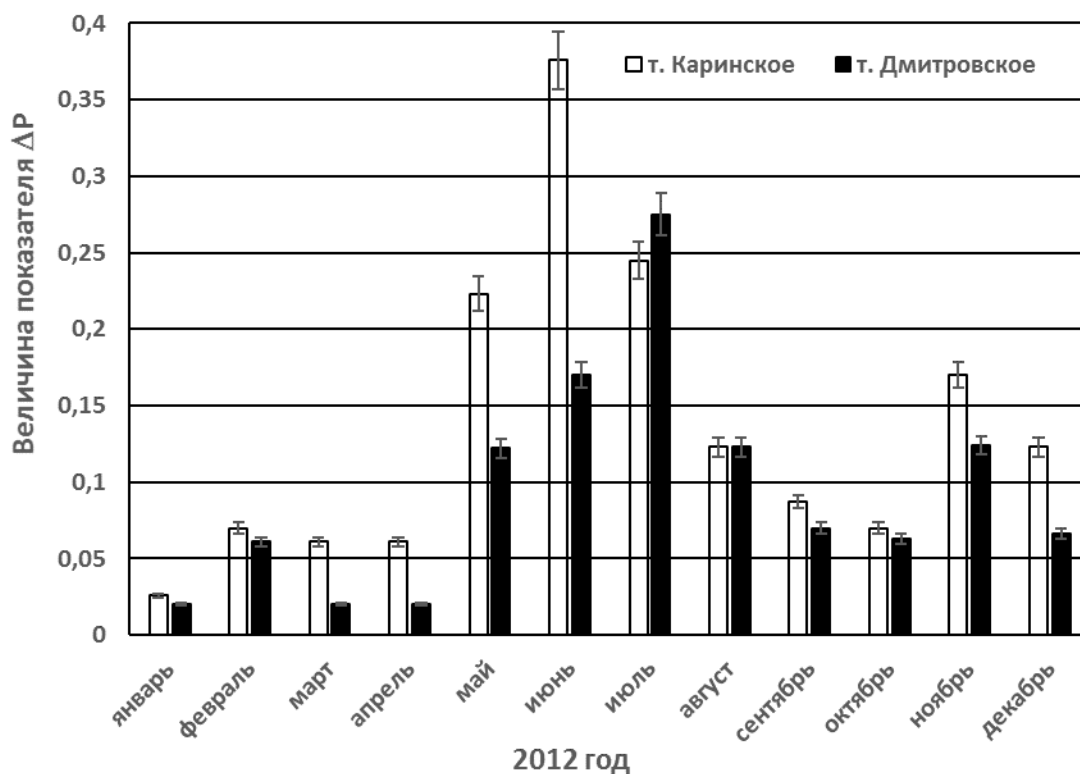
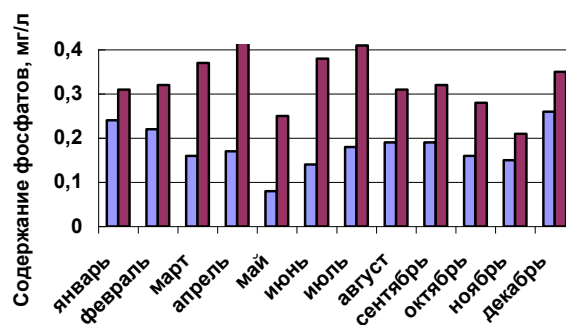
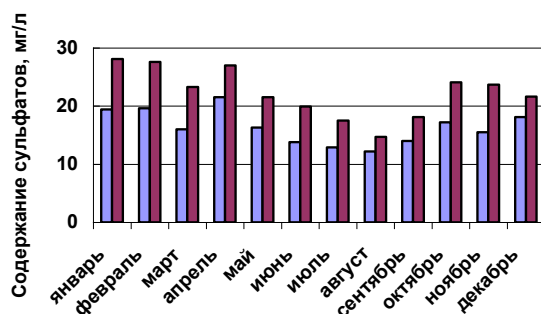
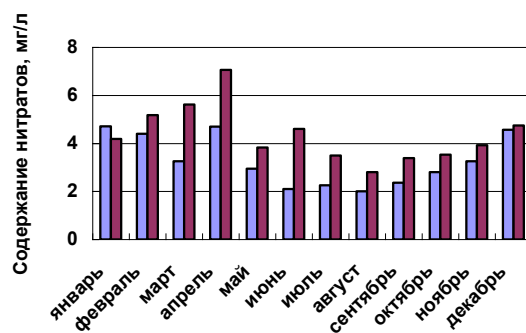
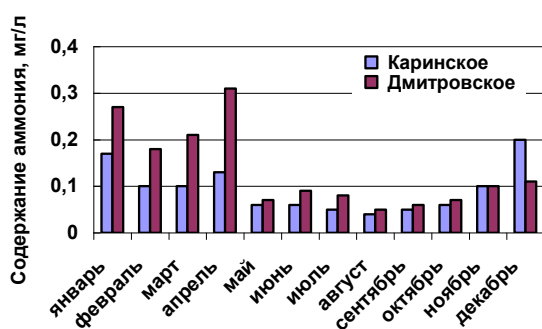


Рис. 4 Динамика показателя ΔP , полученная в годичном эксперименте с использованием диализной культуры цианобактерий *Synechococcus* 6301.

Результаты согласуются с данными по степени загрязнения водной среды в этих точках для таких показателей как содержание органики, определяемое по мутности раствора перманганатным методом (БПК), содержание аммония, нитратов, сульфатов, фосфатов и хлоридов (рис. 5)



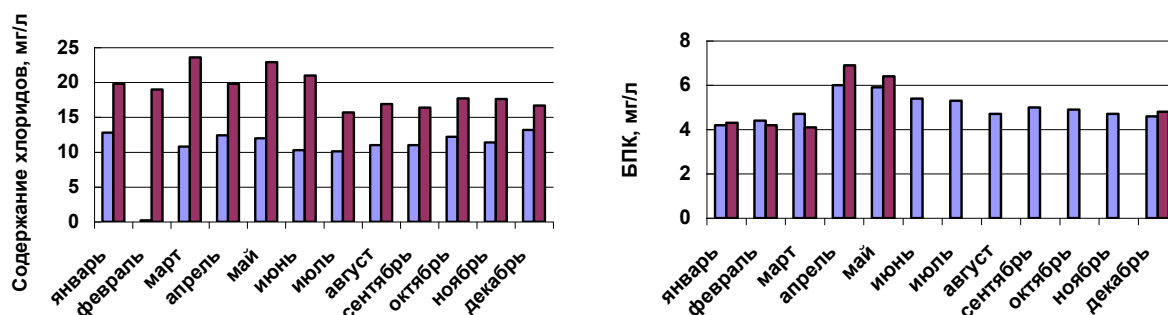


Рис. 5. Содержание аммония, нитратов, сульфатов, фосфатов, хлоридов и БПК в воде, отобранной в т. Каринское и Дмитровское. Погрешности измерений содержания солей в воде и БПК варьировали от 8-10 до 16-20%.

Представляется важным определить наличие корреляции между величиной показателя ΔP и гидрохимическими показателями воды реки Москва.

В связи с этим были построены зависимости для каждого гидрохимического показателя от величины индекса ΔP в годичный период эксперимента отдельно для точек Каринское и Дмитровское. Полученные в результате коэффициенты корреляции для гидрохимических показателей представлены в табл. 2.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции величины индекса ΔP с гидрохимическими показателями проб воды реки Москва в точках Каринское и Дмитровское в течение 2012 г.

№ п/п	Гидрохимический показатель	Коэффициент корреляции r в точках отбора проб	
		Каринское	Дмитровская
1	Аммоний	0,42	0,62
2	Нитраты	0,58	0,51
3	Нитриты	0,75	0,32
4	Сульфаты	0,57	0,64
5	Фосфаты	0,50	0,60
6	Хлориды	0,51	0,35
7	ПБК	0,46	0,59

Как видно, большинство значений коэффициента корреляции превышает уровень 0,5, что свидетельствует о существенной корреляции между этими показателями для воды реки Москва в точках Каринское и Дмитровское. Предположение о независимости ΔP от каждого из гидрохимических показателей отвергается на уровне значимости $\alpha=0,05$. Эти результаты дают нам дополнительное подтверждение наличия взаимосвязи между

величиной показателя ΔP и уровнем загрязненности среды обитания фототрофных микроорганизмов.

На основании полученных результатов построены линейные регрессионные модели зависимости показателя ΔP от всех рассматриваемых гидрохимических показателей для точек Каринское и Дмитровское.

Таким образом, на показатель ΔP могут влиять как абиотические (загрязнения, температура, освещенность), так и биотические факторы среды (изменения биомассы, суммарной численности клеток и соотношения видов в фитопланктоне). Наименьшие значения показателя ΔP в годичном эксперименте наблюдали с декабря по апрель: хотя загрязнители в это время накапливаются главным образом в придонной части водоема, а пробы отбирали в поверхностном слое, в этот период минимально и количество фитопланктона, поглощающего значительную часть загрязнителей в водоеме. Максимальные значения показателя ΔP для обеих точек отбора проб наблюдаются с мая по июль, можно предположить, что это связано с весенне - летним увеличением численности фитопланктона. В т. Каринское биомасса фитопланктона в июне в 6,5 раз меньше, чем в мае, а суммарное число клеток – в 3 раза ниже. В т. Дмитровское в те же месяцы биомасса фитопланктона с мая по июль снижается в 10 раз, а суммарное число клеток – снижается в 5,5 раза. Таким образом, высокие значения показателя ΔP для июльской пробы в т. Дмитровское не могут быть объяснены интенсивным нарастанием биомассы фитопланктона.

3. Сравнительный анализ влияния речного протока, объема взятой речной воды в различные периоды года на показатель ΔP диализной культуры цианобактерии *Synechococcus* 6301

Для переноса эксперимента в природные условия (летний сезон) требовалось оценить влияние на показатель ΔP внешнего объема исследуемой среды. Обычно используемый нами в токсикологических экспериментах объем внешней среды составлял 200-500 мл (Лебедева и др., 2002). В табл. 3 представлены данные по использованию диализной культуры в тестировании проб речной воды объемом 0,5 и 2 л в сравнении с речным протоком. Как видно, значения показателя ΔP в лабораторных условиях и в режиме речного протока практически не различаются, не зависят от объема «внешней» среды, но снижаются при наличии в среде загрязнений.

Исследовалась также возможность использования в качестве тест-объектов и других фототрофных микроорганизмов, которые отличаются от *Synechococcus* 6301 по размерам, строению клетки, организации внешних структур, а также по физиологии.

Установлено, что показатель ΔP существенно изменяется в зависимости от сезона проведения опытов. В речном протоке в августе и, особенно, в сентябре показатель

заметно ниже по сравнению с его значением, полученным в июле. Возможно, это связано с замедлением обменных процессов у микроорганизмов в связи с сезонным снижением температуры и освещенности в водоеме. Но разница между точками отбора проб, которая отражает уровень загрязненности водной среды, при этом сохраняется.

Таблица 3. Величина показателя ΔP для диализной культуры цианобактерии *Synechococcus* 6301, инкубируемой в речном протоке и в лабораторных условиях в 2013 г.

Время проведения опытов	Место проведения опытов или отбора воды	Средняя величина ΔP для пробы из проточной воды	Средняя величина ΔP , определенная в лабораторных условиях		Уровень значимости средней величины ΔP при $\alpha=0.05$
			при 0,5 л внешнего объема	при 2 л внешнего объема	
Июль	Каринское	0,26	0,25	0,25	0,46
	Дмитровское	0,21	0,19	0,20	0,1
Август	Каринское	0,17	0,15	0,16	0,02
	Дмитровское	0,15	0,14	0,14	0,07
Сентябрь	Каринское	0,1	0,09	0,09	0,06
	Дмитровское	0,07	0,06	0,06	0,05

Примечания: содержание клеток цианобактерии в диализном мешке при засеве составляло 3×10^6 . Величины рН, E_h и показателя ΔP составляли 7,0, 330 и 0,25 соответственно. Время инкубации культуры – 2 суток. Для статистической обработки данных использовали критерий Крускала-Уоллиса.

Таблица 4. Величина показателя ΔP для диализных культур цианобактерии *Anabaena variabilis* ATCC 29413 и зеленой микроводоросли *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1, инкубируемых в речном протоке и в лабораторных условиях в 2013 г.

Время проведения опытов	Место проведения опытов или отбора воды	ΔP для пробы из проточной воды	В лабораторных условиях	
			ΔP при 0,5 л внешнего объема	ΔP при 2 л внешнего объема
Июль <i>A. variabilis</i>	Каринское	0,31	0,27	0,35
	Дмитровское	0,30	0,23	0,32
Июль <i>Desmodesmus</i> <i>sp.</i>	Каринское	0,38	0,35	0,35
	Дмитровское	0,33	0,31	0,33
Август <i>A. variabilis</i>	Каринское	0,25	0,25	0,23
	Дмитровское	0,21	0,22	0,19
Август <i>Desmodesmus</i> <i>sp.</i>	Каринское	0,25	0,25	0,23

Примечания: содержание клеток цианобактерии и зеленой микроводоросли в диализном мешке при засеве составляло $2,5 \cdot 10^6$ и $1,8 \cdot 10^4$ кл/мл. Время инкубации культуры – 2 суток. Величины рН, E_h и показателя ΔP составляли для *A. variabilis* и *Desmodesmus* sp. – 6,9 и 7,2, 320 и 350 мВ, а также 0,3 и 0,32 соответственно.

Для исследования влияния на показатель ΔP трех факторов: внешнего объема, месяца отбора пробы и места взятия проб (две точки на р. Москва) – использовался трехфакторный дисперсионный анализ. Чтобы определить, влияет ли величина «внешнего» объема на показатель ΔP , использовали критерий Крускала-Уоллиса (табл. 3). Среднее значение показателя ΔP для проб из проточной воды статистически незначимо на уровне $p > \alpha = 0,05$, отличается от средних значений показателя ΔP для проб объемом 2 л и 0,5 л, полученных в лабораторных условиях. Из этого следует, что величина внешнего объема не влияет на показатель ΔP . Это относится к каждому из месяцев наблюдений и месту взятия пробы. Результаты анализа методом множественных сравнений (метод Дункана), показали, что значения средних ΔP в июле в т. Каринское для всех трех уровней фактора внешнего объема являются наибольшими. А наименьшие значения ΔP для всех трех уровней фактора внешнего объема – значения средних ΔP в сентябре в т. Дмитровское. Изменения значений показателя ΔP в августе и в сентябре заметно меньше по сравнению с его значениями в июле. Возможно, это связано с замедлением обменных процессов у микроорганизмов в связи с сезонным снижением температуры и освещенности в водоеме.

Данные по измерениям показателя ΔP для нитчатой, гетероцистобразующей цианобактерии *A. variabilis* и зеленой микроводоросли *Desmodesmus sp.* представлены в табл. 4. Значения ΔP для обеих культур снижаются в августе по сравнению с июлем, но в меньшей степени, чем для цианобактерии *Synechococcus* 6301. Это может быть связано как с различиями в строении клеток и поверхностных структур исследуемых фототрофных микроорганизмов, так и с различной их чувствительностью к действию загрязнителей.

Заключение

Проведенные исследования показали, что для оценки уровня загрязнения водных объектов может использоваться показатель разности дихроичных отношений полос поглощения белков клеток и их внешних структур (ΔP) культур фототрофных микроорганизмов в ИК диапазоне, различающихся по размерам, строению клетки, организации внешних структур, и физиологии, а также показатель ΔP естественных сообществ фототрофных микроорганизмов исследуемых водоемов.

III. Выводы

1. Изменение условий внешней среды вызывает перестройки белковых компонентов клеточных структур фототрофных микроорганизмов, что может быть выявлено с применением спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне.

2. Методический подход, основанный на измерении разности дихроичных отношений полос поглощения белков клеток фототрофных микроорганизмов и их внешних структур (показатель ΔR), позволяет оценить изменение условий их обитания.
3. Численность клеток в диализной культуре фототрофных микроорганизмов, длительность инкубации и объем внешней среды в исследуемых пределах существенного влияния на величину ΔR в изученных системах не оказывают
4. Предложенный для диализных культур фототрофных микроорганизмов индекс ΔR зависит главным образом от гидрохимического состава исследуемой водной среды.
5. Использование статистических методов анализа и синтеза не только при обработке данных ИК-спектрофотометрии, но и при оценке влияния на показатель ΔR позволяет получить достоверный результат при минимальном количестве исследуемых проб.
6. Разработанный методический подход применим к оценкам состояния популяций как цианобактерий рода *Synechococcus*, так и других фототрофных микроорганизмов.
7. Метод биотестирования, основанный на использовании диализной культуры микроорганизмов, может найти применение для оценок действия факторов окружающей среды в лабораторных исследованиях и в контроле качества вод непосредственно на водных объектах.

Работа выполнена при поддержке НИР «Физико-химические основы молекулярной биоинженерии»

V. Список публикаций по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в журналах, входящих в международные базы данных Scopus, WoS, RSCI:

1. Саванина Я.В., Фомина И.А., Барский Е.Л., Королева С.Ю., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. Диализная культура как индикатор изменений показателей водных ресурсов. // Вестн. Моск. ун-та, Серия 16 «Биология». М.: Изд-во Моск. ун-та. 2013. № 1, с. 21-27.
2. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Лобакова Е.С. Оценка загрязненности водной среды с использованием диализной культуры цианобактерий.// "Поволжский экологический журнал". 2017. № 4. С 426-429.
3. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Лобакова Е.С. Оптические методы анализа диализной культуры цианобактерий для контроля загрязнения водных объектов. //Экологические системы и приборы". 2017. № 12, С. 17-24.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

4. Фомина И.А., Петрова Е.В., Хромов В.М., Лобакова Е.С., Королева С.Ю., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Королев Ю.Н. Выбор методологии анализа параметров для характеристики поведения биосистем. "Проблемы региональной экологии". 2013. № 2, с. 55-57.

5. Фомина И.А., Петрова Е.В., Лобакова Е.С., Королева С.Ю., Саванина Я.В., Королев Ю.Н. Критерии поиска обобщенного показателя состояния водных объектов. Проблемы региональной экологии, 2013. № 3, с. 68-70.

6. Королев Ю.Н., Фомина И.А., Саванина Я.В., Королева С.Ю., Барский Е.Л., Лобакова Е.С. Состояние диализной культуры как модели группового эффекта взаимодействия всех элементов фитопланктонного сообщества. //Сложные системы. М.: изд-во Прият. Компания. 2013. № 3 (8), с. 51-65.

7. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Панченко Л.А. Лобакова Е.С. Метод ИК-спектроскопии внутреннего отражения клеток цианобактерий и их внешних структур для оценки уровня загрязнения водотоков. "Проблемы региональной экологии". 2016. № 6, с. 18-22.

8. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Панченко Л.А. Лобакова Е.С. Сравнительная оценка уровня загрязнения водотоков методом спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне клеток диализной культуры цианобактерий и методами химического контроля. "Проблемы региональной экологии". 2017. № 2, с. 22-26.

9. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Панченко Л.А. Лобакова Е.С. Сравнительная оценка уровня загрязнения водотоков методом спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне клеток диализной культуры цианобактерий и методами химического контроля. "Проблемы региональной экологии". 2017. № 3, с. 22-26.

Другие работы, опубликованные по теме диссертации:

10. Барский Е.Л., Саванина Я.В., Фомина И.А., Лобакова Е.С. 2015. Оценка качества водной среды с использованием цианобактерий. Материалы XXIII Международн. конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». М.: ООО «Новые информационные технологии». С. 224-233.

11. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Лобакова Е.С. 2016. Диализная культура цианобактерий в биомониторинге качества водной среды. Материалы XXIV Международн. конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». М.: ООО «Новые информационные технологии». 2016. С 249-261.

12. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Лобакова Е.С. Биотестирование с использованием спектроскопии внутреннего отражения и биоиндикации. Материалы XXV Международн. конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». М.: ООО «Новые информационные технологии», 2017. С. 105-114.

13. Барский Е.Л., Саванина Я.В., Королева С.Ю., Фомина И.А., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. // Неинвазивная регистрация спектральных характеристик в диализной культуре для контроля загрязнения водных объектов. // в сборнике Оптические методы исследования потоков: 11 Межд. науч-технич. конференция /Электронный ресурс/: труды конференции. М.: МЭИ (ТУ). 2011, серия доклад № 56, с. 1-6.

14. Барский Е.Л., Саванина Я.В., Королева С.Ю., Фомина И.А., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. // Поляризационные характеристики биообъектов и их корреляция с биологическими эффектами при изменении характеристик среды обитания. / в сборнике Оптические методы исследования потоков: 11 Межд. науч-технич. конференция /Электронный ресурс/: труды конференции. М.: МЭИ. 2011, серия доклад № 58, с. 6-9.

Тезисы международных конференций:

15. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Королева С.Ю., Фомина И.А., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. Диализная культура цианобактерий в мониторинге загрязнения природной среды. Международная научно-практическая конференция "Генетико-биохимические аспекты современной биологии клетки". Саранск, 2012. с. 104-106.

16. Королев Ю.Н., Барский Е.Л., Саванина Я.В., Фомина И.А., Королева С.Ю., Лобакова Е.С. О взаимосвязи параметров экосистем с характеристиками входящих в них организмов. Международная научно-практическая конференция "Генетико-биохимические аспекты современной биологии клетки". Саранск. 2012. с. 116-118.

17. Саванина Я.В., Фомина И.А., Барский Е.Л., Асланян Р.Р., Королева С.Ю., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. Индикация загрязнения водной среды с помощью искусственного аналога биопленки. Труды XX Международной конференции и дискуссионного научного клуба. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». 2012. Украина, Ялта-Гурзуф, с. 224-226.

18. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Королева С.Ю., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. «Обобщенный безразмерный показатель» как отражение воздействия на фитопланктон всей совокупности факторов окружающей среды./Труды Междунар конф. «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред». М.:БИНОМ. Лаборатория знаний. 2013. с. 187-187.

19. Саванина Я.В., Королева С.Ю., Петрова Е.В., Фомина И.А., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. Спектральная регистрация структурных характеристик фитопланктонного сообщества. Труды XXI Международной конференции и дискуссионного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Проблемы, методы и продукты современной биотехнологии». 2013. Украина, Ялта-Гурзуф, с.188-189.

20. Барский Е.Л., Буракова О.В., Саванина Я.В., Фомина И.А., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. Популяция одноклеточных цианобактерий в полупроницаемом объеме как модель системы, находящейся в «неограниченном» пространстве водоема, при воздействии всей совокупности факторов окружающей среды. Междунар. научн. конф. «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее», МГУ, Москва, 2014. <http://lomonosov-msu.ru/rus/event/2139/>

21. Барский Е.Л., Буракова О.В., Саванина Я.В., Фомина И.А., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С. Диализная культура одноклеточных цианобактерий как модель биологической системы водоема, которая находится под влиянием факторов окружающей среды. Междунар. научн. конф. «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее», МГУ, Москва, 2014, <http://lomonosov-msu.ru/rus/event/2139/>

Тезисы российских конференций:

22. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Лобакова Е.С. 2017. Мониторинг качества водной среды по состоянию популяции цианобактерий//Всероссийская научно-практическая конференция «Теория и практика гармонизации взаимодействия природных, социальных и производственных систем региона», посвященная Году экологии в Российской Федерации и 50-летию высшего географического образования в Республике Мордовия. Саранск, 12-13 октября 2017 г. Т. 2, С. 60