

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Протопопов Федор Федорович

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ
ФОТОСИСТЕМЫ 2 И 1 У ВОДОРΟΣЛЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
ТОКСИКАНТОВ

03.02.10 – гидробиология, 03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедрах гидробиологии и биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – Маторин Дмитрий Николаевич доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Официальные оппоненты – Горюнова Светлана Васильевна

доктор биологических наук, профессор кафедры безопасности жизнедеятельности и прикладных технологий ГАОУ ВО «Московский городской педагогический университет»

Заворуев Валерий Владимирович

доктор биологических наук, профессор кафедры экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»

Лобакова Елена Сергеевна

доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «06» декабря 2018 г. в «16» часов «30» минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.03 Московского государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. 389.

E-mail: dissovets_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/152692962/>

Автореферат разослан «__» _____ 2018г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Перспективным методом исследования состояния

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

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

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Выявить нарушения в функционировании фотосинтетического аппарата у зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas moewusii* в присутствии ионов метилртути и фенола в разных концентрациях с использованием параметров флуоресценции.
2. Оценить параметры флуоресценции у пигментных мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*
3. Оценить функциональное состояние фотосинтетического аппарата у природного фитопланктона на разных участках Москвы-реки, а также определить сезонные изменения устойчивости фитопланктона к ионам ртути.

Положения, выносимые на защиту:

1. Начальное нарушение фотосинтетических процессов при воздействии ионов метилртути затрагивают акцепторную сторону ФС2 и энергизацию фотосинтетических мембран;
2. Начальное нарушение фотосинтетических процессов при воздействии фенола проявляется в нарушении энергизации фотосинтетических мембран;
3. Мутант *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124y-1 по флуоресцентным параметрам отличается от дикого типа, в том числе и по пигментному составу;

4. Сезонная динамика параметров флуоресценции отличались на разных участках реки Москвы. Эффективность световых реакций фотосинтеза была выше у весеннего фитопланктона по сравнению с летним. Устойчивость фитопланктона к воздействию ионов ртути летом была ниже, чем весной.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение изменений характеристик световых реакций фотосинтеза с помощью одновременной регистрации быстрой и замедленной флуоресценции (БФ и ЗФ) и редокс состояния P700 ФС1 при воздействии ионов метилртути и фенола на культуру водорослей *Scenedesmus quadricauda*. Установлено воздействие метилртути на параметры световых зависимостей флуоресценции хлорофилла водоросли *Chlamydomonas moewusii*. Определены первичные сайты воздействия ионов метилртути и фенола в зависимости от концентрации токсиканта и времени воздействия. При инкубации с концентрациями ионами метилртути 1 мкМ установлено уменьшение максимального квантового выхода флуоресценции первичной фотохимии ФС2, увеличение доли Q_v -невосстанавливающих центров, которая приводила к снижению квантового выхода электронного транспорта ФС2, индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}), а также замедление скорости восстановления реакционных центров (РЦ) ФС1, связанной со снижением донирования электронами от ФС2. Воздействие высоких концентраций ионов метилртути вызывало появление дополнительных сайтов ингибирования — это снижение активности донорной стороны ФС2, акцепторной стороны ФС1 и химического потенциала (ΔpH) на мембране тилакоида. Также наблюдалось значительное увеличение диссипации энергии в тепло антенными комплексами (DI_O/RC).

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

Впервые были изучены характеристики параметров флуоресценции природного фитопланктона на разных участках Москвы-реки. Показано, что рост обилия фитопланктона, оцененное параметром F_0 , в водах реки происходит позднее, чем рост фотосинтетической активности фитопланктона (F_V/F_M). Получены характеристические показатели флуоресценции хлорофилла фитопланктона в зависимости от сезона. Показано, что в весеннее время фитопланктон отличался высокой эффективностью световых реакций фотосинтеза в ФС2, тогда как в середине лета производительность фотосинтетических реакций в ФС2 несколько снижалось. Это характеризовалось изменениями таких параметров флуоресценции хлорофилла как максимальный квантовый выход (F_V/F_M), квантовый выход электронного транспорта ФС2 (ϕ_{E0}) и индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}), максимальной скорости нециклического электронного транспорта (ETR), ростом эффективности нефотохимического тушения (NPQ), а также показателями нерегулируемого нефотохимического тушения в антенном комплексе (ϕ_{D0}). Проведена оценка сезонного изменения устойчивости фитопланктона Москвы-реки к воздействию ионов ртути.

Теоретическое и практическое значение работы. В работе были определены особенности действия соединений ртути и фенола на реакции фотосинтеза фототрофных организмов. Установлены первичные сайты воздействия метилртути и фенола на водорослевые клетки, определены наиболее чувствительные параметры флуоресценции (ϕ_{E0} , PI_{ABS} , I_1/D_2), которые могут быть использованы в биомониторинге.

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

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

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

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

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

Апробация работы. Результаты работы были представлены в материалах конференций: 9th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium (2015, China); V съезд биофизиков России, раздел экологическая биофизика (Ростов на Дону, 2015). Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морские биологические исследования достижения и перспективы» (Севастополь, 2016); Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2016: XI International Science-Technical Conference, (Sevastopol, 2016); Международном симпозиуме и школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, 2016); конференции Математика Компьютер Образование (Москва 2016); II Международной научно-практической конференции «Рациональное природопользование традиции и инновации» (Москва, 2017); III Международной научно-практической конференции "Роль технических наук в развитии общества (Кемерово, 2018). Результаты и выводы работы докладывались и обсуждались на научных семинарах кафедры биофизики и гидробиологии биологического факультета МГУ.

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы дается характеристика строения и функционирования фотосинтетического аппарата растений и водорослей. Рассмотрена природа возникновения флуоресценции и методы её регистрации на флуориметрах разных типов. Приводятся сведения по влиянию различных соединений ртути и фенола на растительные клетки.

Глава 2. Материалы и методы

Объекты исследования – культуры зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, безжгутиковая водоросль *Chlamydomonas moewusii* Gerloff (Lewin 1002, CALU 228), полученная из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета и *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard (дикий тип CC-124 и пигментный мутант CC-124y-1), а также природный фитопланктон Москвы-реки.

Лабораторные исследования. Водоросли выращивали на среде Успенского №1, в экспериментах использовали культуры на экспоненциальной фазе роста (2 сут.). Концентрация клеток в культуре водорослей перед началом экспериментов составляло 250-300 тыс. кл. мл⁻¹. Подсчет клеток проводился в камере Горяева под световым микроскопом. В качестве токсических агентов в работе использовались следующие вещества: хлорид ртути (HgCl₂) (Sigma-Aldrich, США); метилртуть (CH₃Hg⁺) (MeHg chloride) (Sigma-Aldrich, США) и фенол (C₆H₅OH) (Sigma-Aldrich, США). На лабораторных культурах водорослей использовались концентрации ионов метилртути 0,1, 0,5, 1, 10, 100 мкМ, а также фенола в концентрациях 0,01, 0,1, 10 мМ. Для оценки устойчивости фитопланктона Москвы-реки к хлориду ртути использовали концентрации 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 и 100 мкМ.

Полевые исследования. Пробы фитопланктона Москвы-реки отбирались погружным батометром на глубине 0,5 м, рядом с

береговой линией. Участки отбора проб располагались на 3-х точках: вход реки в мегаполис – станция Тушино; станция Воробьевы горы и выход реки из города – станция Дзержинский. Активность (F_V/F_M) и обилие (сигнал F_O) природного фитопланктона исследовали с 2009 по 2010 год. Чувствительность природного фитопланктона к воздействию ионов ртути и изменение флуоресцентных характеристик (JIP-тест, световые кривые) выполняли в летний период 2016 и 2017 года.

Регистрация световых кривых с помощью флуориметра Water-PAM (Walz, Германия). Регистрацию параметров флуоресценции световых зависимостей (Y, ETR и NPQ) выполняли при увеличении световой нагрузки от 0 до 1600 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹. На основании кривой ETR рассчитывались: насыщающая интенсивность света (E_n), коэффициент утилизации световой энергии (α) и находилась максимальная интенсивность нециклического электронного транспорта на свету (ETR_{max}) (Schreiber et al., 2002).

Регистрация быстрой флуоресценции хлорофилла на флуориметре AquaPen-C-100 (PSI, Чехия). Индукционные кривые флуоресценции культур водорослей и природного фитопланктона регистрировались при длине волны возбуждения 630 нм и интенсивностью насыщающей вспышки 3000 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с помощью стандартного протокола измерения «OJIP». На основе полученных индукционных кривых БФ рассчитывались параметры JIP-теста (Strasser et al., 2004).

Одновременная регистрация быстрой флуоресценции (БФ), замедленной флуоресценции (ЗФ) и отражения при 820 нм осуществлялась с помощью multifunctional прибора M-PEA-2 (Hansatech Instruments, Великобритания). Прибор позволял следить за отдельными реакциями, протекающим в ФС2 и ФС1, а также оценивать изменения энергизации мембраны тилакоида (индукционной кривой микросекундной ЗФ). Флуоресценция возбуждалась светом с длиной волны $\lambda = 625 \pm 10$ нм и интенсивностью 1500 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ длительность протокола измерения составляла 60 с. Индукционные кривые ЗФ регистрировалась в режиме «Multi», т. е. в режиме множественного чередования освещения и темноты в течение всего измерения. Интенсивность излучения при 820 нм составляла 500 мкмоль

квантов·м⁻²·с⁻¹. Перед измерением водоросли адаптировали не менее чем 15 минут к темноте, затем осаждали на фильтр с помощью вакуумной установки. Ранее проведенные исследования на флуориметре Aqua-Pep-C-100 показали, что процедура обогащения проб на фильтре не оказывало влияния на физиологическое состояние клеток (Маторин, Алексеев, 2013).

Спектры поглощения измеряли с помощью портативного спектрофотометра на базе USB2000 (Ocean Optics, США), а также на спектрофотометре HITACHI-557 (Япония). Спектры возбуждения флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Flourlog-3 (Horiba Jobin Yvon).

Определение концентрации хлорофилла а в воде проводили флуориметрическим методом с помощью сертифицированного флуориметра МЕГА-25, созданном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ.

Программное обеспечение. Анализ, обработку и построение графиков проводили с помощью программного обеспечения M-PEA-data-analyzer V.5.2, Microsoft Excel 2016, Statistica v. 10, OriginPro 9.1. Статистические расчеты проведены с помощью пакета Statistica v.10 (StatSoft, США). Проверка статистических гипотез при сравнении двух независимых выборок осуществлялась непараметрическим критерием Манна-Уитни, для множественного сравнения независимых выборок использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Уровень значимости принимали за $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты исследования и обсуждение

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

При инкубации водорослей с метилртутью в течение 3 ч не отмечалось существенных изменений в пигментном составе. Однако при более длительной инкубации (более 24 ч) фиксировали относительное увеличение поглощения в области каротиноидов (430–480 нм) по сравнению с контролем.

В присутствии метилртути в концентрации 1 мкМ существенно снижалась скорость роста культур *S. quadricauda* и *C. moewusii*. На 2 сут. инкубации с ионами метилртути при концентрации 1 мкМ наблюдался медленный рост культур

водорослей, тогда при концентрациях выше 10 мкМ снижение количества клеток водорослей продолжалось до 3 сут. и более.

Измерение световых зависимостей параметров флуоресценции хлорофилла показало, что в присутствии метилртути снижалась скорость линейного электронного транспорта (ETR) при концентрации 0,1 мкМ (рис.1А). Также было показано снижение коэффициента максимальной утилизации световой энергии (α) и насыщающей интенсивности света (E_n). При коротких временах инкубации (3 ч) с метилртутью нефотохимическое тушение (NPQ) повышалось, а при длительных временах инкубации понижалось (24 и 48 ч).

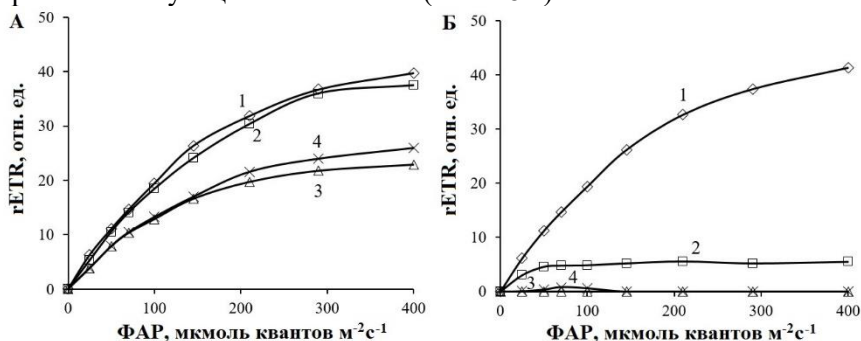


Рисунок 1 Изменение параметра относительной скорости электронного транспорта (ETR) в зависимости от интенсивности действующего света в клетках водоросли *C. toewusii*, обработанных метилртутью в концентрации 0,1 мкМ (А) и 0,5 мкМ (Б) при разных временах инкубации. 1 – контроль, 2, 3, 4 – время инкубации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

С помощью одновременной регистрации БФ, ЗФ и редокс состояния P700 прослежено влияние ионов метилртути на фотосинтетические реакции, протекающие в двух фотосистемах и во всей электрон транспортной цепи. Исследование флуоресцентных характеристик индукционных кривых БФ водорослей, инкубированных с ионами метилртути показало, что после 3 и 24 ч ингибировалась акцепторная сторона ФС2, что проявлялось в увеличении параметра V_J (табл. 1). Параметр V_J связывают с долей Q_B -невосстанавливающих центров ФС2, которое ухудшает электронный транспорт далее акцептора Q_A^- и приводит к

снижению квантового выхода электронного транспорта (Φ_{E0}) за пределы Q_A . Общее уменьшение функциональной активности ФС2 проявляется в снижении значения параметра индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}). Воздействие метилртути приводило к снижению количества активных РЦ в ФС2, о чем свидетельствует увеличение параметра ABS/RC . Снижение количества активных РЦ приводило к уменьшению максимального квантового выхода флуоресценции (F_v/F_m) и увеличению квантового выхода диссипации поглощенной энергии в тепло (Φ_{D0}). При воздействии концентраций 10 и 100 мкМ метилртуть вызывала рост параметра M_0 , показывающий начальную скорость роста кривой БФ. Снижение донирования электронов от кислород-выделяющей системы (КВС) к РЦ ФС2 вызывает быстрый рост флуоресценции с образованием $P680^+$ состояний РЦ, и появлением характерного пика К и значительным снижением амплитуды О-Р (рис. 2).

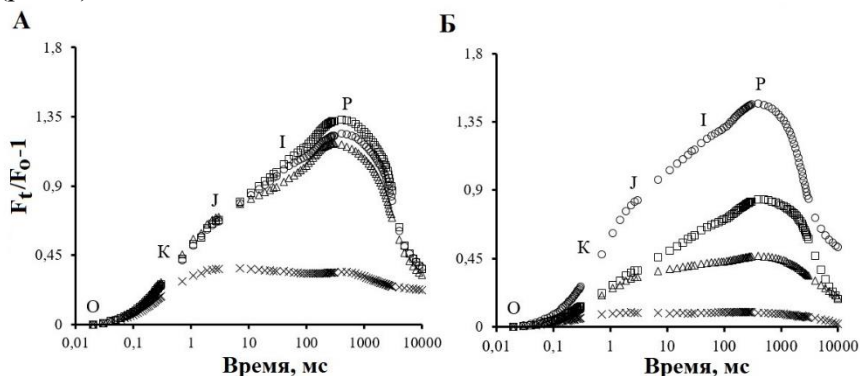


Рисунок 2. Индукционные кривые БФ культуры *S. quadricauda*, измеренные после 3 ч (А) и 24 (Б) ч инкубации в присутствии метилртути. Индукционные кривые представлены после нормирования на уровень О ($=F_0$) и приведены к нулю (F_t/F_0-1). Контрольная культура водорослей (кружок) и инкубированные с метилртутью образцы при разных концентрациях: 1 мкМ (квадрат) 10 мкМ (треугольник) и 100 мкМ (крест).

На рисунке 3 представлены светоиндуцированные окислительно-восстановительные переходы Р700 РЦ ФС1. Воздействие концентрации 1 мкМ метилртути не оказывало влияния на скорость окисления Р700, однако замедляла скорость

восстановления окисленных центров P700⁺, в результате ингибирования электронного транспорта от ФС2. После 3 ч инкубации в присутствии 10 мкМ метилртути скорость окисления P700 (V_{ox}) замедляется на 10% по сравнению с контролем, а при концентрации 100 мкМ скорость окисления замедляется более чем в 2 раза (табл. 1).

Индукционную кривую 3Ф можно разделить на две кинетические фазы – быструю и медленную (рис. 4). Быстрая фаза начинается подъемом свечения к максимуму I_1 и заканчивается локальным минимумом D_2 через приблизительно 0,3–0,5 с от начала освещения, после чего начинается медленная фаза изменений 3Ф (I_3), которая за несколько минут освещения заканчивается достижением светового стационарного уровня 3Ф (Гольцев и др., 2014). Как показано на рисунке 4, при воздействии

Таблица 1. Параметры БФ, 3Ф и редокс состояния P700 водоросли *S. quadricauda* после инкубации 3 ч и 24 ч с ионами метилртути. В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий между контролем и опытными образцами принят за $p<0,05(*)$

Время инкубации	3 часа				24 часа			
Параметры	К	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	К	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ
F_V/F_M	0,62 (100%)	0,57 (92%)	0,54 (87%)	0,27* (44%)	0,59 (100%)	0,46* (77%)	0,32* (53%)	0,09* (15%)
M_O	0,89 (100%)	0,82 (92%)	0,95 (107%)	2,84* (319%)	0,61 (100%)	0,64 (103%)	1,06* (176%)	2,72* (256%)
V_J	0,54 (100%)	0,56 (92%)	0,59 (110%)	0,99* (184%)	0,51 (100%)	0,54 (106%)	0,7* (137%)	0,84* (165%)
Φ_{Eo}	0,29 (100%)	0,25* (86%)	0,22* (76%)	-	0,3 (100%)	0,21* (70%)	0,1* (33%)	-
Φ_{Do}	0,38 (100%)	0,43 (113%)	0,46 (121%)	0,73* (192%)	0,41 (100%)	0,54* (132%)	0,68* (166%)	0,91* (222%)
ABS/RC	2,66 (100%)	2,57 (97%)	2,98 (112%)	10,63* (400%)	2,0 (100%)	2,58* (129%)	4,73* (237%)	35,98* (1799%)
PI_{ABS}	0,523 (100%)	0,405* (78%)	0,274* (52%)	0,68 (100%)	0,682 (100%)	0,282* (41%)	0,043* (6%)	0,405* (78%)

I_1/D_2	2,23 (100%)	1,82* (82%)	1,67* (75%)	1,07* (48%)	2,09 (100%)	1,43* (68%)	1,39* (67%)	1* (48%)
I_3/D_2	1,27 (100%)	1,06* (83%)	1,05* (83%)	0,96* (76%)	1,21 (100%)	1,15 (95%)	1* (83%)	0,99* (82%)
V_{ox}	3,71 (100%)	3,68 (97%)	2,72* (80%)	1,4* (48%)	2,84 (100%)	2,77 (99%)	2,28* (73%)	1,36* (38%)

метилртути наблюдали снижение интенсивности ЗФ, после 3 часовой инкубации в присутствии 1, 10, 100 мкМ метилртути происходило значительное снижение максимума I_1/D_2 . Известно, что во время быстрой фазы происходит накопление в ФС2 состояний $S_3ZP680^+Q_A^-$ и $S_3ZP680Q_A^-$, появление этих предшественников ЗФ и подъем энергизации мембраны ($\Delta\psi$) приводит к росту интенсивности ЗФ (Goltsev et al., 2009). Учитывая это, снижение пика I_1/D_2 в присутствии метилртути мы расцениваем как свидетельство снижения количества этих

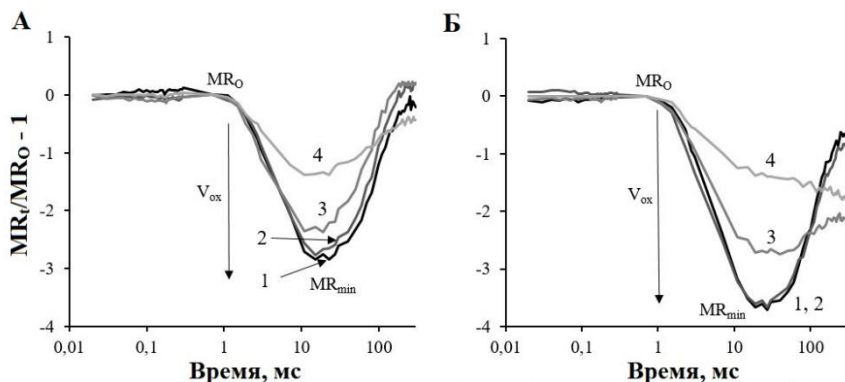


Рисунок 3. Окислительно–восстановительные превращения P700 РЦ ФС1 у водоросли *S. quadricauda* при инкубации с метилртутью в течение 3 ч (А) и 24 ч (Б). Контрольная культура водорослей (1) и инкубированные с метилртутью образцы различных концентраций: 1 мкМ (2) 10 мкМ (3) и 100 мкМ (4). Все кривые модулированного отражения (MR_t) нормированы на начальное значение MR_0 (интенсивность при $t=0,7$ мс) и приведены к нулю.

излучательных состояний и увеличении числа закрытых РЦ, которые не испускают кванты ЗФ, а также в снижении потенциала ($\Delta\psi$) на мембране тилакоида. Увеличение продолжительности инкубации с токсикантом до суток приводило ещё к более

значительному снижению пика I_1/D_2 , а также снижению медленного пика I_3/D_2 .

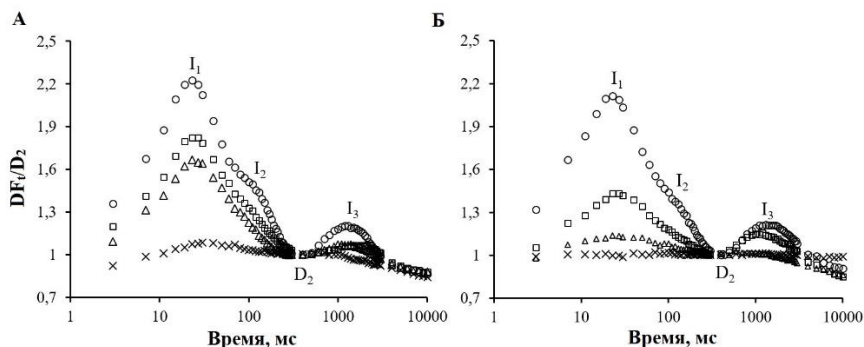


Рисунок 4. Индукционные кривые ЗФ у водоросли *S. quadricauda* после инкубации с метилртутью 3 ч (А), 24 ч (Б). Контрольная культура водорослей (кружок) и инкубированные с метилртутью образцы при различных концентрациях: 1 мкМ (квадрат) 10 мкМ (треугольник) и 100 мкМ (крест). Кривые ЗФ нормированы на локальный минимум D_2 (при $t \approx 400$ мс).

Снижение интенсивности быстрой и медленной фазы ЗФ свидетельствует об уменьшении электрохимического градиента протонов ($\Delta\psi$ и ΔpH соответственно) на мембране тилакоида.

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

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

Проведены комплексные исследования влияния фенола на фотосинтетические реакции водоросли *S. quadricauda*. Анализ кривых БФ с помощью JIP-теста выявил изменения при воздействии фенола только в концентрации 1 мМ. Наблюдалось в частности, умеренное снижение квантового электронного выхода далее Q_A

(Φ_{E0}), вызванное ухудшением переноса электрона между акцепторами Q_A и Q_B на акцепторной стороне ФС2 (ψ_0) (табл. 2).

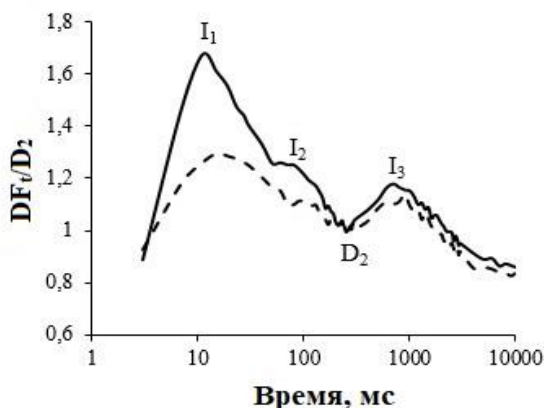


Рисунок 5. Индукционные кривые ЗФ водоросли *S. quadricauda* после 3 часов инкубации с фенолом. Контроль (сплошная линия) и с фенолом в концентрации 0,1 мМ (пунктирная).

Предполагается, что увеличение фазы O-J отражает накопление Q_B -невосстанавливающих центров ФС2 (Strasser et al., 2004). Показано, что при воздействии фенола в концентрации 1 мМ значительно снизился индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}). Воздействие фенола на клетки водоросли не снижало скорость окисления P700, но последующее восстановление замедлялось вследствие ингибирования электронного транспорта между фотосистемами. Такие изменения согласуются с уменьшением квантового выхода электронного транспорта далее Q_A (Φ_{E0}).

Одновременное измерение миллисекундной ЗФ позволило оценить изменение градиента электрохимического потенциала на мембране тилакоида при воздействии фенола (рис. 5). Фенол в концентрации 0,1 мМ подавлял все пики ЗФ, но сила воздействия на разные пики ЗФ была не одинаковой, фенол значительно сильнее снижал пик I_1/D_2 , тогда как интенсивность медленного пика I_3/D_2 снижалась не столь сильно (табл. 2). Это дает основание предположить, что фенол сильнее влияет в первую очередь на электрическую составляющую ($\Delta\psi$) электрохимического потенциала на мембране тилакоида.

Таким образом, воздействие фенола отличается от воздействия ионов метилртути. При концентрации 0,1 мМ фенол снижает энергизацию мембраны (I_1/D_2), а именно электрическую ($\Delta\psi$) компоненту электрохимического градиента. При увеличении концентрации фенола (1 мМ) помимо снижения энергизации мембраны тилакоида появляется дополнительный сайт воздействия — это акцепторная сторона ФС2 (Φ_{E0} , ψ_0). Выявлено, что фенол практически не воздействовал на акцепторную сторону ФС1.

Таблица 2. Параметры флуоресценции (БФ, ЗФ) водоросли *S. quadricauda* после 3-х ч инкубации с различными концентрациями фенола. В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий между контролем и опытными образцами принят за $p<0,05(*)$

Параметры	Контроль	Фенол		
		10 мкМ	0,1 мМ	1 мМ
F_v/F_m	0,724 (100%)	0,710 (98%)	0,712 (98%)	0,702* (96%)
ψ_0	0,661 (100%)	0,663 (100%)	0,641 (97%)	0,602* (91%)
Φ_{E0}	0,479 (100%)	0,471 (98%)	0,456 (95%)	0,423* (88%)
PI_{ABS}	3.92 (100%)	3.60 (92%)	3.22 (82%)	2.43* (62%)
I_1/D_2	1,68 (100%)	1,51 (90%)	1,26* (75%)	0,91* (54%)
I_3/D_2	1,18 (100%)	1,17 (100%)	1,15 (97%)	0,91* (77%)

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

Ранее были показаны возможность и достоинства использования пигментного мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-124y-1) для оценки мутабельности проб воды при мониторинге состояния окружающей среды (Садвакасова и др., 2016; Маторин и др., 2016). Для расширения характеристики столь перспективного мутантного штамма был исследован его пигментный состав и

охарактеризован набор параметров флуоресценции. На рисунке 6 приведены спектры поглощения и возбуждения флуоресценции дикого (СС-124) и мутантного типа *C. reinhardtii* (СС-124у-1). У мутантного типа наблюдали уменьшение поглощения в области пиков хлорофилла *b* и каротиноидов. Разница между спектром возбуждения флуоресценции и спектром поглощения показала, что часть каротиноидов не была связана с РЦ и они выполняли экранирующую роль.

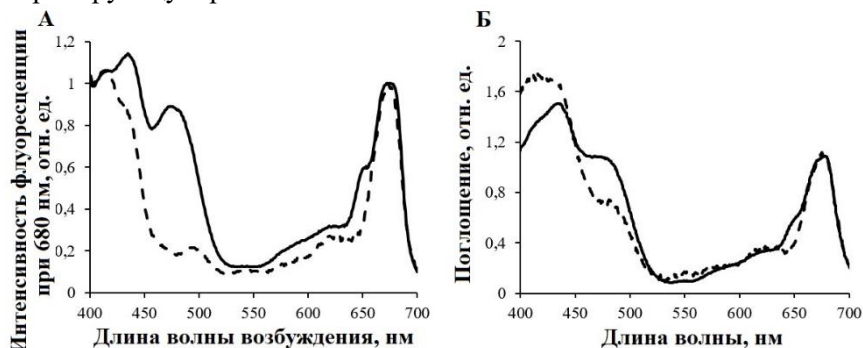


Рисунок 6. Спектры возбуждения флуоресценции при длине волны регистрации 680 нм (А) и спектр поглощения (Б) водоросли *C. reinhardtii*. Сплошной линией представлен дикий тип СС-124, а пунктирной линией мутантный тип СС-124у-1. Спектры нормированы на красный максимум поглощения хлорофилла *a* при длине волны 675 нм.

Анализ параметров световых кривых (табл. 3) позволил выявить, что мутантный тип значительно эффективнее перерабатывает повышенную световую нагрузку ($Yield$ при 600 мкмоль квантов $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$), чем дикий тип (табл. 3). Вполне возможно, что у мутанта СС-124у-1 нарушаются механизмы передачи энергии между антенными комплексами, которая приводит к уменьшению эффективного размера светособирающей антенны (α) и повышению интенсивности насыщающего света (E_n). Несмотря на отсутствие хлорофилла *b* и ещё некоторые отличия у мутантного типа процессы нефотохимического тушения не нарушаются и показывают высокую способность к нефотохимическому тушению (NPQ при 600 мкмоль квантов $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$).

Параметры JIP-теста индукционных кривых БФ и параметры ЗФ показали некоторые отличия мутантного и дикого типа.

Наиболее характерные из них для мутантного типа это малый размер относительного антенного комплекса (ABS/RC), а также отличия в квантовом выходе электронного транспорта (Φ_{E0}) и индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}).

Таблица 3. Основные параметры РАМ-флуориметрии водоросли *C. reinhardtii* дикого (СС-124) и мутантного типа (СС-124у-1). Уровень значимости отличий между диким и мутантным типом принят за $p < 0,05(*)$

Параметры флуоресценции	СС -124	СС -124у-1
Yield при 25 мкмоль квантов $M^{-2} C^{-1}$	0,598 (100%)	0,319 (53%)*
Yield при 600 мкмоль квантов $M^{-2} C^{-1}$	0,132 (100%)	0,202 (153%)*
NPQ при 25 мкмоль квантов $M^{-2} C^{-1}$	0,087 (100%)	0,054 (62%)*
NPQ при 600 мкмоль квантов $M^{-2} C^{-1}$	0,156 (100%)	0,263 (169%)*
ETR _{max}	27,5 (100%)	35,6 (139%)*
α	0,248 (100%)	0,087 (35%)*
E _n	111 (100%)	410 (370%)*

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

Параметры флуоресценции, характеризующие фотосинтетическую активность фитопланктона (F_v/F_m) и концентрацию хлорофилла (F_0) были измерены в течение года в поверхностном слое Москвы-реки на трех участках, различающихся по уровню загрязненности. Станции располагались при входе реки в черту города в Тушино, в середине города на Воробьевых горах и на выходе реки из города в Дзержинском. Характеристика уровня загрязненности дана в докладах о состоянии окружающей среды в 2010 и 2017 гг. департаментом природопользования и охраны

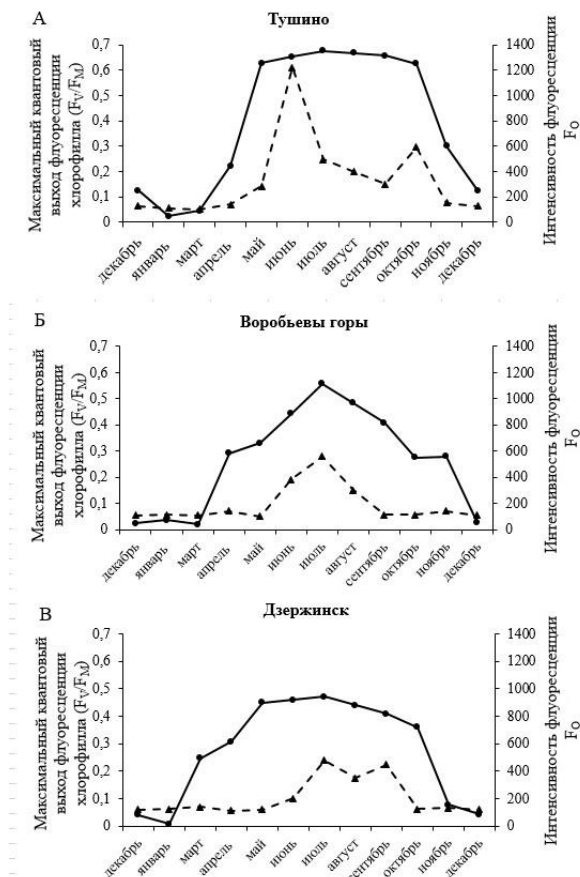


Рисунок 7. Динамика параметра максимального квантового выхода (F_v/F_m) (сплошная линия) и минимального уровня флуоресценции (F_o) (штриховая линия) в поверхностном слое воды Москвы-реки: А – на станции Тушино; Б – на станции Воробьевы горы; В – на станции Дзержинский.

окружающей среды города Москвы: Тушино - условно чистый участок, Воробьевы горы и Дзержинский - слабо загрязненные участки.

Сезонный ход фотосинтетической активности фитопланктона и концентрации хлорофилла отличался на трех станциях (рис. 7). На станции Тушино фитопланктон характеризовался высокой активностью РЦ (F_v/F_m) с мая по октябрь

включительно при наличии двух пиков биомассы (F_0). На станции Воробьевы горы пик активности и биомассы фитопланктона приходился на июль. На станции Дзержинский увеличение фотосинтетической активности началось на месяц раньше, чем на других станциях, наибольшие значения F_v/F_m выявлены в мас-октябре, а наибольшие значения биомассы - в июле – сентябре. На всех участках реки в весенний период увеличение фотосинтетической активности фитопланктона начиналось раньше увеличения биомассы водорослей, что согласуется с данными полученными на культуре водорослей ранее, а именно – повышение активности РЦ ФС2 при наступлении благоприятных условий (Маторин, Алексеев, 2013)

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

Детальные исследования в 2016–2017 гг. выявили, что эффективность световых реакций фотосинтеза в ФС2 выше весной по сравнению с летом. Так у весеннего фитопланктона максимальный квантовый выход (F_v/F_m), квантовый выход электронного транспорта ФС2 (ϕ_{E0}) и индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}), максимальная скорость нециклического электронного транспорта (ETR) были выше, а эффективность нефотохимического тушения (NPQ) и показатель нерегулируемого нефотохимического тушения в антенном комплексе (ϕ_{D0}) были ниже таковых у летнего фитопланктона.

Оценка параметров флуоресценции F_v/F_m и PI_{ABS} природного фитопланктона при воздействии ионов ртути показала, что индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) является более чувствительным параметром, чем максимальный квантовый выход флуоресценции (рис. 8). Отличия параметра PI_{ABS} от контроля проявлялись при самой низкой испытуемой концентрации токсиканта. Фитопланктон с разных участков реки проявлял разную устойчивость к воздействию ионов ртути только в весенний период. Летом устойчивость фитопланктона была ниже по сравнению с весной без выраженных различий между станциями. Сезонное изменение устойчивости может быть обусловлено изменением видового состава фитопланктона.

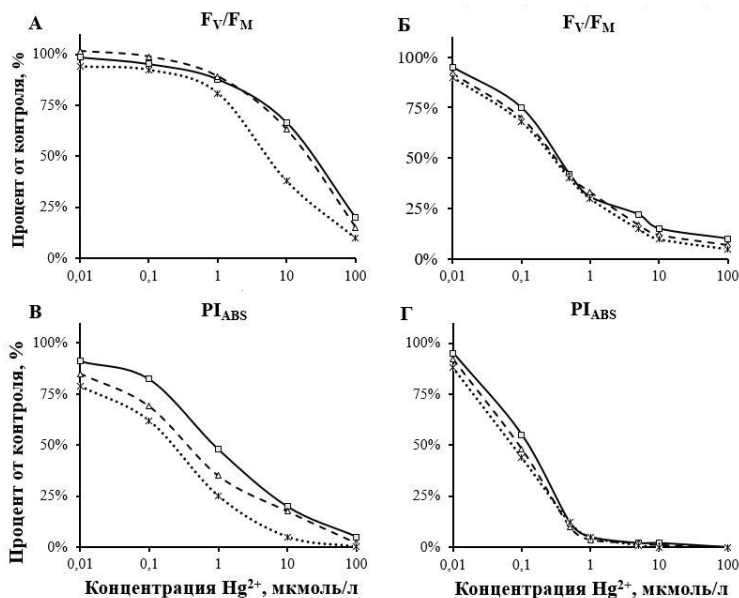


Рисунок 8. Максимальный квантовый выход флуоресценции (F_v/F_m) (А, Б) и индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) (В, Г) фитопланктона Москвы-реки в весеннее (А, В) и летнее (Б, Г) время после 3 часов инкубации в присутствии ионов ртути. Кривые представлены в виде снижения флуоресцентных параметров (F_v/F_m , PI_{ABS}) относительно контроля в процентах. Станции отбора проб для исследования: Тушино (сплошная линия), Воробьевы горы (штриховая линия) и Дзержинский (пунктирная линия).

Заключение

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

которому стало возможно следить за протеканием отдельных фотосинтетических реакций на нативных объектах.

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

Апробирование подхода регистрации флуоресцентных параметров на природном фитопланктоне Москвы-реки показало, что фотосинтетическая активность фитопланктона по всему руслу была неодинаковой. Наиболее высокие значения активности фотохимических процессов были обнаружены у фитопланктона на условно чистом участке реки (на входе в город), тогда как на слабо загрязненных участках (середина реки и на выходе из города) активность была снижена. Эксперименты по инкубации природного фитопланктона в присутствии ртути выявили различия в устойчивости к токсическому воздействию у фитопланктона с разных участков, а также более высокую устойчивость весеннего фитопланктона по сравнению с летним. Наиболее чувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла – индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) и квантовый выход электронного транспорта (ϕ_{E0}), которые можно рекомендовать при проведении биотестирования и мониторинга активности световых реакций фотосинтеза фитопланктона в природных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Токсический эффект ионов метилртути на световые реакции зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas toewusii* проявлялся начиная с концентрации 0,1 мкМ. Наблюдалось снижение относительной скорости нециклического электронного транспорта (ETR), и нарушения на акцепторной стороне ФС2 – снижались квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (ϕ_{E0}), индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) и энергизация мембраны тилакоидов ($\Delta\psi$ и ΔpH). При более высоких концентрациях токсиканта нарушения затрагивают кислород-выделяющую систему и акцепторную сторону ФС1. Скорость роста водорослей снижается уже при концентрации 0,1 мкМ ионов метилртути.
2. В присутствии фенола у водоросли *S. quadricauda* снижалась электрическая компонента ($\Delta\psi$) энергизации фотосинтетических мембран, что проявлялось в снижении параметра индукции замедленной флуоресценции при 10-50 мс (I_1/D_2). При более высоких концентрациях фенола нарушения затрагивали акцепторную сторону ФС2 (ϕ_{E0} , ϕ_0).
3. У водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* выявлены достоверные различия в параметрах флуоресценции штамма дикого типа CC-124 и мутантного штамма CC-124y-1, у которого отсутствует хлорофилл *b*.
4. Сезонная динамика параметров флуоресценции – максимального квантового выхода (F_V/F_M) и минимальной флуоресценции (F_0) фитопланктона различалась на участках реки Москва, расположенных при входе реки в черту города, в середине города и на выходе из города. Эффективность световых реакций (ϕ_{E0} , PI_{ABS} , ϕ_{D0}) фотосинтеза в ФС2 была выше у весеннего фитопланктона по сравнению с летним.
5. Устойчивость фитопланктона реки Москвы к воздействию ионов ртути была выше в весенний период в сравнении с летим. Наибольшую чувствительность к воздействию ионов ртути на водоросли показал параметр флуоресценции хлорофилла индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}).

Список работ, опубликованных по теме диссертации
Статьи, опубликованные в журналах, индексируемых
аналитическими базами Scopus, WoS, RSCI и в изданиях,
рекомендованных ВАК РФ

1. **Протопопов Ф.Ф.** Влияние метилртути на параметры световой зависимости флуоресценции зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* / **Ф.Ф. Протопопов**, Д.Н. Маторин, Н.Х. Сейфуллина, Л.Б. Братковская, Б.К. Заядан // Микробиология. –2015. –Т.84. –№6. –С. 725-731. **Protopopov F.F.**, Effect of methylmercury on the light dependence fluorescence parameters in a green alga *Chlamydomonas moewusii* / **F.F. Protopopov**, D.N. Matorin, N.Kh. Seifullina, L.B. Bratkovskaya, B.K. Zayadan // Microbiology. – 2015. V.84. –N.6. –P.822-827.
2. Мошарова И.В. Мониторинг вод реки Москва с помощью микробиологических параметров и флуоресценции хлорофилла *a* / И.В. Мошарова, В.В. Ильинский, Д.Н. Маторин, С.А. Мошаров, А.Ю. Акулова, **Ф.Ф. Протопопов** // Микробиология. –2015. –Т.84. –№6. –С. 712-724. Mosharova I.V. Monitoring of the Moskva river water using microbiological parameters and chlorophyll *a* fluorescence / I.V. Mosharova, V.V. Il'inskii, D.N. Matorin, S.A. Mosharov, A.Yu. Akulova, **F.F. Protopopov** // Microbiology. –2015. V.84. –N.6. –P.811-821.
3. Маторин Д.Н. Изучение биофизических характеристик пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с использованием флуориметра М-РЕА-2 / Д.Н. Маторин, **Ф.Ф. Протопопов**, А.К. Садвакасова, А.А. Алексеев, Л.Б. Братковская, Б.К. Заядан // Биофизика. –2016. –Т.61. –№4. –С. 717-725. Matorin D.N. Estimation of biophysical characteristics for *Chlamydomonas reinhardtii* pigment mutants with an M-PEA-2 fluorometer / D.N. Matorin, **F.F. Protopopov**, A.K. Sadvakasova, A.A. Alekseev, L.B. Bratkovskaja, B.K. Zayadan // Biophysics. –2016. –V.61. –№4. –P.606-613.
4. Садвакасова С.К. Пигментные мутанты зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: изучение их морфологических свойств и состояния фотосинтетического аппарата / Н.Р. Акмуханова, Б.К. Заядан, Д.Н. Маторин, **Ф.Ф. Протопопов**, А.А. Алексеев, К. Болатхан // Физиология растений. –2016. –Т.63. –№4. –С. 472-480. Sadvakasova A.K. Pigment mutants of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: morphological properties and photosynthetic performance /

A.K. Sadvakasova N.R. Akmukhanova, B.K. Zayadan, D.N. Matorin, **F.F. Protopopov** // Russian journal of plant physiology. –2016. –V.63. – N.4. –P.443-450.

5. Маторин Д.Н. О возможности использования флуоресценции хлорофилла для оценки токсического действия фенолов на зеленые водоросли / Д.Н. Маторин, С.Н. Горячев, **Ф.Ф. Протопопов**, М.В. Иванов, В.Ю. Пономарев, П.С. Венедиктов // Естественные и технические науки. –2015 –Т.89. –№11. –С.148-150.

Список работ, опубликованных в сборниках статей:

6. Габбасова Д.Т. Защитное действие гуминовых веществ в отношении токсического эффекта наночастиц серебра и золота на микроводоросли / Д.Т. Габбасова, Д.Н. Маторин, Б.К. Заядан, **Ф.Ф. Протопопов**, А.А. Алексеев // Вестник КазНУ. –2014. –Т.1. – №2. –С. 93-95.

7. Слепнева В.О. Изучение реакций переноса электронов в ФС2 у голодающих по магнию клеток *Chlamydomonas reinhardtii* / В.О. Слепнева, О.Г. Лаврухина, А.А. Волгушева, Т.К. Антал, Г.П. Кукарских, **Ф.Ф. Протопопов**, Д.Н. Маторин, Т.Е. Кренделева // в сб. наука и образование в жизни современного общества. – Тамбов, –2015. –Т.6. –С.128-129.

8. Габбасова Д.Т. Использование параметров быстрой флуоресценции хлорофилла для оценки влияния ионов хромата на микроводоросли / Д.Т. Габбасова, **Ф.Ф. Протопопов**, Н.П. Тимофеев, Д.Н. Маторин // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии. –М., –2016. –С. 328-330.

9. **Протопопов Ф.Ф.** Изучение токсического действия тяжелых металлов на микроводоросли с использованием импульсного флуориметра М-РЕА-2 / **Ф.Ф. Протопопов**, Н.П. Тимофеев, Д.Т. Габбасова, Д.А. Тодоренко, А.А. Алексеев, Д.Н. Маторин // в сборнике морские биологические исследования: достижения и перспективы. –Севастополь, –2016. –Т.3. –С. 194-197.

10. Маторин Д.Н. Методы флуоресцентного зондирования фитопланктона в природных водоемах / Д.Н. Маторин, **Ф.Ф. Протопопов**, Д.А. Тодоренко, В.Ю. Пономарев, С.Н. Горячев, А.А. Алексеев // Рациональное природопользование: традиции и инновации. –М., –2017. –С. 187-190.