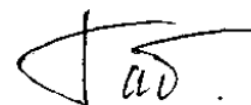


На правах рукописи



ГАББАСОВА ДИЛАРА ТАГИРОВНА

**ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА
СВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕЗА В ПРИСУТСТВИИ ГУМИНОВЫХ
ВЕЩЕСТВ**

03.02.08 – Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре гидробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет 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: **Юрий Георгиевич Симаков**

доктор биологических наук, профессор кафедры биоэкологии и ихтиологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г.Разумовского»

Заворуев Валерий Владимирович

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

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»

Защита диссертации состоится «27» сентября 2018 г. в «14» часов «00» минут на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертации Д 212.203.38 при Российском университете дружбы народов по адресу: 115093, г. Москва, Подольское шоссе, д. 8/5, экологический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте dissovet.rudn.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Е.А. Ванисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В современных условиях значительный интерес представляет исследование токсичности различных загрязняющих веществ, в том числе, современных наноматериалов (Смуров А.В., 2003; Терехова В.А. с соавт., 2014; Филенко О.Ф., 1988; Черных Н.А., Сидоренко С.Н., 2003). Наряду с такими известными загрязнителями окружающей среды как тяжелые металлы и ионы хрома, широкое распространение приобрели наночастицы (НЧ). Стремительное развитие нанотехнологий приводит к увеличению выброса различных наночастиц в среду, где их судьба и поведение неизвестны (Голохваст К.С. с соавт., 2012). Уникальные свойства НЧ, такие как высокая удельная поверхность и подвижность, может привести к неожиданным для здоровья человека и окружающей среды последствиям (Шайтан К.В., 2011). Наночастицы серебра широко используются в медицине, текстиле, красках, в качестве пищевых добавок, упаковочной тары для продуктов питания. Из-за относительно дешевого производства наноалмазы (ДНА), производимые путем детонационного синтеза, используются в качестве горюче-смазочных материалов, в авиа- и автомобилестроение, медицине, химической промышленности. Данные вещества могут существенно влиять на фототрофные организмы, обеспечивающие энергией все экосистемы. Уменьшить токсическое воздействие этих веществ могут природные детоксиканты - гуминовые вещества. Гуминовые вещества (ГВ) присутствуют во всех природных средах и выполняют ряд экологических функций, как в естественных, так и в антропогенных экосистемах (Якименко О.С., 2016; Kulikova N.A., 2005). ГВ могут повышать доступность питательных веществ, положительно влиять на физико-химические и биологические свойства почвы, а также существенно изменять поведение токсикантов путем связывания их в нетоксичные комплексы или влияя на процессы окисления-восстановления токсикантов (Перминова И. В. с соавт., 2004).

Одним из общепринятых индикаторов устойчивости состояния растительного компонента экосистем является оценка эффективности процессов фотосинтеза в ответ на воздействия окружающей среды (Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., 2011). Фотосинтез лежит в основе почти всех экологических систем на земле и представляет сложную систему преобразования энергии света, состоящую из двух фотосистем (ФС II и ФС I), осуществляющих нециклический электронный транспорт с разложением воды и выделением кислорода, образованием НАДФН₂ и АТФ. Нарушения в первичных процессах фотосинтеза отражаются в изменениях флуоресценции хлорофилла *a*. В настоящее время развиваются методы анализа световых и индукционных кривых флуоресценции, позволяющих на интактных объектах следить за основными стадиями фотосинтетической электрон-транспортной цепи. (Гольцев В.Н. с соавт., 2014; Маторин Д.Н., Рубин А.Б., 2012; Strasser R.J. et. al., 2010). В настоящее время измерения кинетики индукции флуоресценции все шире используются при проведении экологического мониторинга.

Однако исследований по воздействию ионов хрома и современных наноматериалов на световые реакции фотосинтеза микроводорослей и высших растений в присутствии ГВ практически не проводились.

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей действия ионов хрома, НЧ алмаза и серебра на световые реакции фотосинтеза микроводорослей и высших растений и выявление изменений их устойчивости в присутствии ГВ различного происхождения с использованием современных флуоресцентных методов.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Оценить влияние ГВ черноземных почв на световые реакции фотосинтеза микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*.
2. Выявить начальные нарушения фотосинтетического аппарата у микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum* и *Scenedesmus quadricauda* в присутствии ионов хрома и изменение их устойчивости при добавлении ГВ с использованием параметров флуоресценции.
3. Изучить влияние ДНА на световые реакции фотосинтеза микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* и проростков растений пшеницы *Triticum aestivum L* в присутствии различных ГВ.
4. Исследовать токсическое действия НЧ серебра на микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* и изменение их устойчивости при разных режимах добавления ГВ.
5. Определить наиболее чувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла для использования в экологическом мониторинге загрязнений в окружающей среде.

Научная новизна. Впервые, с использованием параметров индукции флуоресценции установлено, что ГВ обладают стимулирующим воздействием на световые реакции фотосинтеза микроводоросли *S. quadricauda*. ГВ ускоряли электронный транспорт (F_{E0}), стимулировали максимальную фотохимическую эффективность ФС II (F_v/F_m), эффективность кислородвыделяющего комплекса (F_v/F_0) и индекс производительности (PI_{ABS}). Установлено влияние ГВ на фотосинтетические мембраны клеток. Гуминовые кислоты (ГК) обладают более выраженным стимулирующим воздействием по сравнению с фульвокислотами (ФК), что, по-видимому, связано с относительной обогащенностью структуры ГК ароматическими фрагментами.

Впервые при одновременной регистрации индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния P700 у морской водоросли *P. tricornutum* и пресноводной *S. quadricauda* в присутствии ионов хрома было показано, что одно из первых мест воздействия соединений шестивалентного хрома локализовано на акцепторной части ФС II между переносчиками Q_A и Q_B . Отмечено влияние на донорную часть ФС II при высоких концентрациях ионов хрома. В присутствии ионов хрома обнаружена активация циклического транспорта электронов. Показано, что токсикологический эффект ионов хрома снижался в присутствии ГВ.

При исследовании влияния НЧ серебра и алмаза на микроводоросли *S. quadricauda* было обнаружено, что они могут ингибировать эффективность фотосинтеза микроводорослей на акцепторной части ФС II. Это отражено в снижении таких параметров флуоресценции как максимальная фотохимическая эффективность ФС II (F_v/F_m), электронный транспорт (F_{E0}), индекс производительности (PI_{ABS}). При исследовании воздействия НЧ серебра, синтезированных с ГВ, наблюдали возрастание токсического эффекта на микроводоросли *S. quadricauda*. Впервые, выявлено, что ДНА проникают в растения пшеницы *Triticum aestivum L* и проявляют токсичность в условиях повышенного освещения, что ведет к уменьшению переноса электрона между акцепторами Q_A и Q_B и нарушению формирования трансмембранного потенциала. В присутствии ГК наблюдался детоксицирующий эффект, который в первую очередь определялся изменениями дзета-потенциала ДНА.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

- установлено положительное влияние ГВ на световые реакции фотосинтеза

микроводорослей;

- определены области начальных нарушений фотосинтетического аппарата в присутствии ионов хрома, НЧ алмаза и серебра;

- доказано повышение устойчивости реакции фотосинтеза микроводорослей в присутствии ГК к действию ионов хрома, НЧ алмаза и серебра;

- определены параметры индукции флуоресценции хлорофилла, которые могут быть использованы в экологическом мониторинге загрязнений окружающей среды.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной диссертационной работе были изучены особенности действия ионов хрома и современных токсикантов: ДНА и НЧ серебра на световые реакции фотосинтеза фототрофных организмов и защитные свойства ГВ различного происхождения.

Предложен способ оценки влияния ГВ, сочетания ГВ и токсикантов на световые реакции фотосинтеза микроводорослей и высших растений с использованием параметров индукции флуоресценции хлорофилла. Установлены наиболее чувствительные параметры флуоресценции (PI_{ABS} , Φ_{E_0} , F_V/F_0), которые могут быть использованы в экологическом биомониторинге для определения влияния различных токсикантов и ГВ на фотосинтезирующие организмы. Показатель флуоресценции (F_0) с успехом может быть использован в биотестировании для оценки влияния токсикантов на ростовые процессы микроводорослей.

Материалы диссертации могут быть внедрены в учебный процесс по дисциплинам - «Экология» и «Охрана окружающей среды и рациональное использование ресурсов».

Полученные результаты использовали в учебном процессе при проведении практикума по экологической биофизике на Звенигородской станции МГУ и большого практикума кафедры биофизики МГУ.

Метод флуоресценции хлорофилла был внедрен в исследования по биотестированию в лабораторию экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) на факультете почвоведения МГУ.

Апробация работы. Результаты работы представлены в следующих научных конференциях: 4-я международная конференция СНГ МГО по гуминовым инновационным технологиям «От молекулярного анализа гуминовых веществ – к природоподобным технологиям» (Москва, 2017); II всероссийская научная конференция молодых ученых «Комплексные исследования Мирового океана» (Москва, 2017); всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Морские биологические исследования: достижения и перспективы», приуроченная к 145-летию Севастопольской биологической станции (Севастополь, 2016); международный симпозиум «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, 2016); 10-я международная конференция «Углерод: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, технология» (Троицк, 2016); 3-й международный симпозиум «Nanomaterials and the Environment» (Moscow, 2016); конференция Математика Компьютер Образование 2016 (Москва, 2016); V съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 3 в цитируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI, а одна из них опубликована в высокорейтинговом журнале.

Исследования выполнялись при поддержке грантов РФФИ: «Поиск границ нормы

для биоиндикационных показателей фитопланктона в многофакторных экспериментах с лабораторными альгоценозами» (№ 15-04-02601), «Метод поиска экологически обоснованных границ классов качества для объективной классификации природных экосистем» (№ 15-04-02129).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и обсуждений, заключения, выводов, списка условных сокращений и обозначений, списка цитируемой литературы. Список литературы включает 275 источников. Работа изложена на 159 страницах машинного текста, содержит 42 рисунка и 11 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В разделе 1.1 приведено описание первичных световых процессов фотосинтеза и их роль в экологических системах. Рассматривается анализ индукции флуоресценции хлорофилла с помощью ЛР – теста, природа быстрой и замедленной флуоресценции, характеризующие состояние фотосинтезирующего объекта. Приведено описание основных флуоресцентных методов, таких как РАМ-флуориметрия, регистрирующая световые зависимости параметров флуоресценции. В разделе 1.2 рассматривается характеристика ГВ и их роль в природе. Приведены сведения о прямых и косвенных положительных воздействиях ГВ на растительный компонент экосистемы и их связывающей способности по отношению к различным токсикантам. В разделах 1.3, 1.4, 1.5 приведена информация о возможном токсическом воздействии на экологические биосистемы ионов хрома, НЧ серебра и алмаза.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили рекомендованные в биотестировании морские *P. tricorutum* и пресноводные *S. quadricauda* микроводоросли и растения пшеницы *Triticum aestivum* L. Для проведения экспериментов использовали культуры микроводорослей в экспоненциальной фазе роста. Микроводоросли *P. tricorutum* из коллекции кафедры гидробиологии МГУ выращивали на искусственной морской питательной среде Гольдберга в модификации Кабановой с концентрацией соли 20 г/л при температуре $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и освещенности 30 мкмоль квантов $\cdot\text{м}^{-1}\text{с}^{-2}$, 16 ч в сутки. Микроводоросли *S. quadricauda* были выращены на среде Успенского при температуре $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и периодическом освещении 30 мкмоль квантов $\cdot\text{м}^{-1}\text{с}^{-2}$ (фотопериод 12 ч день/12 ч ночь). Численность микроводорослей определялась микроскопически методом прямого счета в камере Горяева ($V=0,0001$ мл) при трехкратном ее заполнении. Проростки мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. были перемещены в питательный раствор Кнопа (pH 5.5) и затем выращены в вегетационной камере (фотопериод 12 ч день/12 ч ночь, освещенность 200 мкмоль квантов $\cdot\text{м}^{-1}\text{с}^{-2}$; температура 24°C). Корни растений были промыты в дистиллированной воде и перенесены на 72 ч в пробирки, содержащие ДНА и ГВ.

В качестве токсикантов использовали шестивалентный хром ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), НЧ серебра (“Sigma Inc.”, США), ДНА (Синта, Беларусь). Средний размер НЧ серебра составил около 80 ± 13 нм. Средний размер ДНА 150 нм.

Меченные тритием ДНА получены на химическом факультете МГУ и предоставлены Бадун Г.А. (Badun G.A. et al., 2014). Определение дзета - потенциала проводилось на химическом факультете под руководством Волкова Д.С. (Volkov D.S. et al., 2012).

В работе были использованы гуминовые препараты чернозема Курской области, ГВ реки Суванни (стандартные образцы международного гуминового общества), ГВ угля.

Регистрацию световых кривых фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции проводили на флуориметре Water-PAM (Walz, Германия). Измерения световых зависимостей проводится при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 1500 мкмоль квантов·м⁻¹с⁻². В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности с использованием насыщающей вспышки (0,8 с, 3000 мкмоль квантов·м⁻¹с⁻²) регистрируются параметры F_M' и выход флуоресценции на свету $F_{(t)}$. На основании измеренных уровней флуоресценции рассчитывали следующие параметры: $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ - максимальный квантовый выход разделения зарядов в ФС II; $Yield = (F_M' - F_t)/F_M'$ - эффективный квантовый выход в ФС II на свету; $NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$ - нефотохимическое тушение флуоресценции и $rETR = Yield \cdot 0,5 \cdot E_I$ - относительная скорость электронов по электрон-транспортной цепи, где E_I - освещенность (мкмоль квантов·м⁻¹с⁻²). Из световой кривой ($rETR$) рассчитывали: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой (α)), максимальную относительную скорость электронов по электрон-транспортной цепи (ETR_{max}) и насыщающую интенсивность света ($E_n = ETR_{max}/\alpha$).

Параметры индукции быстрой флуоресценции (БФ) микроводорослей регистрировали на флуориметре Aqua-Pen (Photon Systems Instruments, Чехия) с использованием красного света. Возбуждение красным измеряющим светом важно для работы с образцами, содержащие ГВ, которые имеют большое фоновое свечение при возбуждении синим светом. Индукционная кривая БФ отражает постепенное восстановление переносчиков в электрон-транспортной цепи (Рисунок 1). Индукционные кривые флуоресценции анализировали с помощью JIP-теста (Маторин Д.Н., Рубин А.Б., 2012; Strasser R.J. et al., 2004). JIP-тест использует следующие параметры кривой индукции флуоресценции: интенсивность при 20 мкс (F_0), 2 мс (F_J), 30 мс (F_I), 6 с (F_{6s}), а также F_P (F_M , максимальная интенсивность флуоресценции) и M_0 (площадь над кинетической кривой OJIP, но ниже уровня F_M). Эти измеряемые величины использовали для расчета следующих параметров: $F_V = F_M - F_0$ - максимальная переменная флуоресценция; F_V/F_M - максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции; F_V/F_0 - характеризует изменения в эффективности расщепления воды (выделения кислорода) в ФС II; $V_J = (F_J - F_0)/F_V$ - относительная амплитуда O-J фазы, отражает количество закрытых реакционных центров (РЦ) по отношению к общему числу РЦ, которые могут быть закрыты; $V_I = (F_I - F_0)/F_V$ - относительная амплитуда J-I фазы, которая отражает способность ФС I и ее акцепторов окислять пул пластохинонов; $V_K = (F_K - F_0)/F_V$ - указывает на нарушения в процессе разложения воды; $M_0 = 4 \cdot (F_{300mкс} - F_0)/F_V$ - начальный наклон фазы O-J роста флуоресценции; $ABS/RC = M_0(1/V_J)(1/\phi_{P_0})$ - поток энергии, поглощаемый одним активным РЦ; $ET_0/RC = M_0(1/V_J)$ - поток электронов, переносимых через один активный РЦ, при $t = 0$; $DI_0/RC = (ABS/RC) - TR_0/RC$ - общее количество энергии, рассеиваемой одним РЦ в виде тепла; $\phi_{E_0} = ET_0/ABS = \phi_{P_0}\psi_0$ - квантовая эффективность переноса электронов от Q_A ; $PI_{ABS} = (RC/ABS) (\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0}))(\psi_0/(1 - \psi_0))$ - обобщающий показатель функциональной активности ФС II; $q_E = (F_M - F_{6s})/F_V$ - ΔpH-зависимое нефотохимическое тушение.

Регистрация индукционных кривых быстрой, замедленной флуоресценции и редокс-превращения пигмента реакционного центра ФС I – P700 микроводорослей

и листьев растений проведена на многофункциональном анализаторе М-РЕА-2 (Hansatech Instruments, Великобритания). Прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями ФС I и ФС II. Кроме того, прибор регистрирует индукционные изменения замедленной флуоресценции (ЗФ), которые дают информацию о кинетике электрохимического градиента протонов на фотосинтетической мембране. Типичные кривые приведены на рисунке 1. Флуоресценцию хлорофилла *a* и изменение рассеяния света при длине волны 820 нм индуцировали красным светом (625 нм±10 нм) с интенсивностью 1500 (для микроводорослей) или 5000 (для высших растений) мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ в течение 60 с. ЗФ регистрировалась в режиме «Multi», т.е. в режиме чередования освещения свет-темнота.

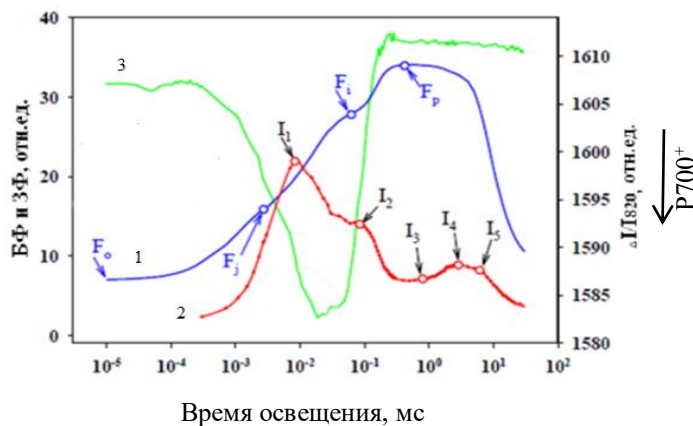


Рисунок 1. Индукционные кривые быстрой (кривая 1) и замедленной флуоресценции (кривая 2) и окислительно-восстановительные реакции ФС I (кривая 3) после освещения листовых пластинок пшеницы, адаптированных в течение 1 часа в темноте. Стрелками указаны характеристические точки индукционных кривых. Индукционные кривые измерены одновременно на приборе М-РЕА-2.

Для измерения кинетики окисления и восстановления P700⁺ была использована высокочувствительная установка с регистрацией изменений пропускания при 820 нм. Образец освещали актиничным светом (700 нм) с интенсивностью 5000 мкмоль квантов·м⁻¹·с⁻² в течение 20 мс, и после выключения света регистрировали кинетику восстановления P700⁺.

Спектры поглощения регистрировали на приборе с интегрирующей сферой на базе спектрометра USB2000 (Ocean Optics, США) и на спектрофотометре HITACHI-557 (Япония). Спектры испускания, спектры возбуждения флуоресценции и затухание флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon).

Определение размера наночастиц проводили с использованием анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Программное обеспечение. Измеренные сигналы флуоресценции обрабатывали с использованием программного обеспечения М-РЕА-data-analyzer V.5.2 (София, Болгария). Статистические расчеты проведены с помощью пакета Statistica v.10 (StatSoft, Inc., США). Проверка статистических гипотез на сравнение двух независимых выборок осуществлялась непараметрическим критерием Манна-Уитни, уровень значимости принят за P<0,05. А также с помощью метода группирования выборок с наименее значимой разницей - LSD ($\alpha = 0,05$). Для определения тесноты и достоверности связи между параметрами применяли критерий корреляции Спирмена. Измерения проводились в пятикратной повторности. Перед измерением все образцы выдерживали в темноте в течение 30 мин.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка влияния гуминовых веществ на световые реакции фотосинтеза зеленой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*

В главе 3 приведены данные о влиянии ГВ на скорость роста и реакции фотосинтеза микроводоросли *S. quadricauda*. Ранее подобные исследования не проводились. Влияние ГВ на скорость роста микроводоросли *S. quadricauda* оценивали по изменению параметра флуоресценции (F_0), который связан с обилием клеток микроводоросли (Маторин Д.Н., Рубин А.Б., 2012). Обнаружено, что ГВ черноземных почв в нормальных условиях обладали слабовыраженным стимулирующим воздействием на рост микроводоросли (Рисунок 2).

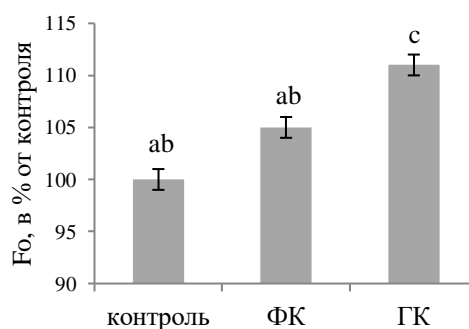


Рисунок 2. Количество клеток микроводоросли *S. quadricauda*, рассчитанное по изменению параметра F_0 при добавлении ГК и ФК черноземных почв (10 мг/л) через 72 ч инкубации.

Изменения в функционировании фотосинтетического аппарата при действии ГВ исследовали с помощью световых зависимостей параметров флуоресценции (Рисунок 3). Обнаружили, что внесение ГВ приводит к увеличению скорости нециклического электронного транспорта фотосинтеза (ETR) (Рисунок 3А). При этом ГК черноземных почв в большей степени стимулировали электронный транспорт по сравнению с ФК. Также установлено, что ГК влияют на состояние фотосинтетических мембран, что привело к увеличению нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), отражающего изменение электрохимического протонного градиента на мембране (Рисунок 3Б). ФК практически не оказывали воздействие на состояние фотосинтетических мембран. Предположение о возможном влиянии ГК на мембраны клеток ранее высказывались в литературе (Garcia A.C. et al., 2016; Gholami H. et al., 2013; Olaetxea M. et al., 2016; Seyedbagheri M.M., 2010).

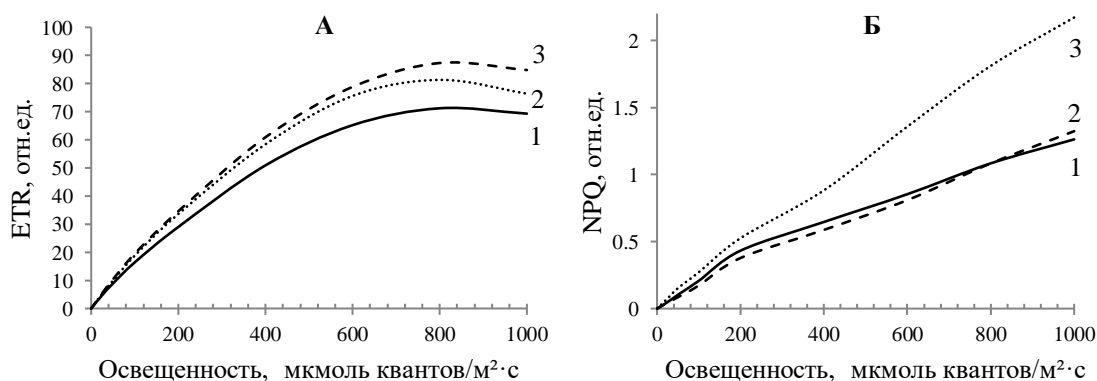


Рисунок 3. Изменения световых кривых параметров флуоресценции микроводоросли *S. quadricauda* при влиянии ГК и ФК черноземных почв в

концентрации 10 мг/л и времени инкубации 24 часа. А – относительная скорость нециклического фотосинтетического электронного транспорта (ETR), Б – нефотохимическое тушение флуоресценции в мембранах (NPQ). 1 – контроль, 2 – ФК черноземных почв, 3 – ГК черноземных почв.

Детальное исследование воздействия ГВ на световые реакции фотосинтеза было проведено при регистрации индукционных кривых флуоресценции в миллисекундном интервале времени, после включения действующего света. Измерение флуоресценции на разных фазах кривой позволяет судить о постепенном восстановлении переносчиков электронов между двумя ФС (Strasser R.J. et al., 2004). В таблице 2 приведены параметры, рассчитанные из индукционных кривых флуоресценции хлорофилла клеток микроводорослей в присутствии ГВ. Эксперименты показали, что ГВ могут оказывать стимулирующее воздействие на функционирование фотосинтетического аппарата микроводорослей. Это отражено в изменении параметра F_V/F_M – максимального квантового выхода ФС II, связанного с разложением H_2O и выделением O_2 . Значение данного параметра в присутствии ГК увеличивалось до 11 %. При этом ФК не оказали выраженного стимулирующего воздействия.

Таблица 2. Параметры флуоресценции хлорофилла микроводоросли *S. quadricauda* при воздействии ГВ черноземных почв в концентрации 10 мг/л и времени инкубации 24 часа. В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий принят за $P<0,05(*)$. % – процентное изменение от контроля.

Параметр	Значение параметров флуоресценции в присутствии ГВ		
	Контроль	ФК черноземных почв	ГК черноземных почв
F_V/F_M	0,53 (100%)	0,54 (102%)	0,59 (111%)
Φ_{E_0}	0,29 (100%)	0,30 (103%)	0,37* (128%)
PI_{ABS}	0,57 (100%)	0,66* (116%)	1,3* (228%)
ABS/RC	2,4 (100%)	2,3 (96%)	1,9* (79%)
DI_O/RC	1,1 (100%)	1,0 (91%)	0,77* (70%)

Параметр индекса производительности (PI_{ABS}) в присутствии ГК увеличивался вдвое, что говорит о степени увеличения функциональной активности ФС II. Это происходит из-за повышения доли активных РЦ и снижения тушения возбужденных состояний в светособирающей антенне. Повышение доли активных РЦ приводит к уменьшению размера светособирающей антенны на один РЦ (ABS/RC). Увеличение активных РЦ и квантовой эффективности переноса электронов от QA^- (Φ_{E_0}) приводит к снижению нефотохимических потерь световой энергии при фотосинтезе (DI_O/RC).

Исследование параметров индукционных кривых флуоресценции показало, что ГВ могут оказывать стимулирующее воздействие на рост и функционирование фотосинтетического аппарата микроводоросли *S. quadricauda*. Определение изменений эффективности процессов фотосинтеза по параметрам индукции флуоресценции может быть предложено для оценки степени влияния различных ГВ на фототрофные организмы.

3.2. Начальные нарушения фотосинтетического аппарата у микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* в присутствии ионов хрома

Ионы хрома широко применяются в металлообрабатывающей, кожевенной, текстильной, химической, лакокрасочной, пиротехнической промышленности, а также они рекомендованы в биотестировании. Детальное исследование воздействия ионов хрома на световые реакции фотосинтеза морской микроводоросли *P. tricornutum* ранее не проводилось. Ввиду этого было исследовано влияние ионов хрома на скорость роста и параметры флуоресценции хлорофилла морской микроводоросли *P. tricornutum*. При использовании прямого счета клеток в камере Горяева было показано, что ионы хрома могут сильно ингибировать скорость роста морской микроводоросли *P. tricornutum*, начиная с концентрации 2,5 мг/л (Рисунок 4).

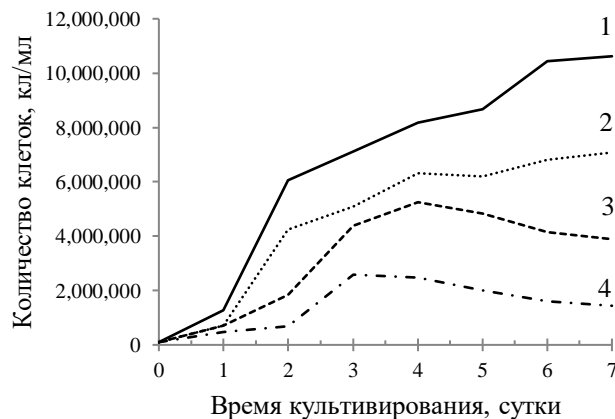


Рисунок 4. Изменение прироста численности клеток (N) *P. tricornutum* в течение 7 суток инкубации в зависимости от концентрации $K_2Cr_2O_7$. 1 – контроль, 2 – 2,5 мг/л, 3 – 5 мг/л, 4 – 10 мг/л.

Ранее отмечалось, что интенсивность флуоресценции (F_0) коррелирует с содержанием хлорофилла и может служить показателем численности клеток водорослей (Matorin D.N. et al., 2013). Результаты наших экспериментов показали, что тест-функция прироста численности клеток водорослей (N) и показатели флуоресценции (F_0), хорошо согласуются друг с другом с коэффициентами корреляции не меньше 0,98. Этот факт подтверждает возможность использования показателя флуоресценции (F_0) для биотестирования морских вод с использованием микроводоросли *P. tricornutum* в качестве тест-объекта.

Спектры поглощения суспензий микроводорослей практически не изменялись при коротком (24 ч) времени инкубации, что свидетельствует об отсутствии влияния ионов хрома на пигментный аппарат. Однако при более длительной инкубации фиксировали относительное увеличение поглощения в области каротиноидов (430– 480 нм) по сравнению с контролем (Рисунок 5), что обычно происходит при действии стрессовых факторов.

Для детальной оценки изменений фотосинтетической активности в клетках *P. tricornutum* на приборе М-РЕА-2 были одновременно измерены индукционные кривые быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния Р700 в миллисекундном интервале времени (Рисунок 6). Исследование параметров быстрой флуоресценции показало, что одно из первых мест воздействия соединений шестивалентного хрома локализовано на акцепторной части ФС II. Это наглядно

отражает параметр квантового выхода электронного транспорта в ФС II (Φ_{E0}), значение которого в присутствии ионов хрома снижалось (Таблица 3).

Ингибирующее воздействие отражает общий показатель флуоресценции PI_{ABS} , который имеет более низкие показатели у обработанных хромат-ионами микроводорослей, что указывает на низкую функциональную активность ФС II. Это происходит в основном из-за снижения доли активных РЦ и повышения тушения возбужденных состояний в светособирающей антенне. Происходит уменьшение эффективности передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на РЦ, что сопровождается увеличением рассеивания неиспользуемой световой энергии (DI_0/RC).

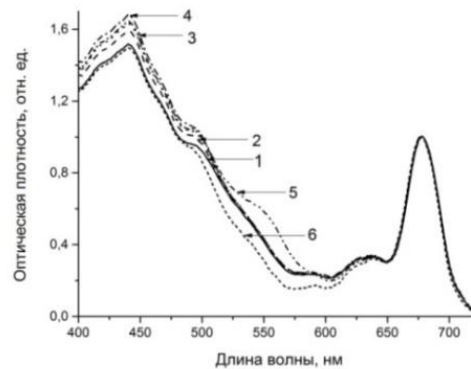


Рисунок 5. Спектры поглощения клеток микроводоросли *P. tricornutum* при действии различных концентраций $K_2Cr_2O_7$: 1- контроль, 2 – 6 - клетки инкубировали 72 ч в присутствии $K_2Cr_2O_7$ (2,5; 5; 10; 15; 25 мг/л, соответственно). Спектры нормированы на красный максимум хлорофилла *a* при длине волны 678 нм.

В условиях стресса, вызванного различными причинами (Гольцев В.Н. с соавт., 2014; Lazar D., Schansker G., 2009; Strasser R.J. et al., 2010), на кривых флуоресценции (примерно на 300 мкс) наблюдается резкий переход от фазы O-J к фазе J-I, с образованием «ступеньки» т.е. дополнительного пика К (Рисунок 6А). Данный К-пик связан с нарушениями на донорной стороне ФС II. При повышенных концентрациях ионов хрома на кривой флуоресценции был обнаружен К-пик, описываемый параметром V_K (Таблица 3), который указывает на нарушения в процессе разложения воды.

Исследование индукции ЗФ показали уменьшение интенсивности флуоресценции микроводоросли в присутствии ионов хрома (Рисунок 6Б), что возможно свидетельствует об уменьшении формирования электрохимического градиента через тилакоидную мембрану.

Исследуемый токсикант воздействовал на активность ФС I. Как видно из рисунка 6В, микроводоросли при обработке низкими концентрациями хромат-ионов сохраняют способность пигмента ФС I (P700) к окислению при включении света. При больших концентрациях наблюдается существенное подавление реакций окисления P700 в ФС I.

При исследовании кинетики темнового восстановления $P700^+$, кинетические кривые были разложены на две компоненты: быструю и медленную. В присутствии хромат-ионов происходило относительное снижение амплитуды быстрой фазы восстановления, что указывает на уменьшение потока электронов от ФС II к $P700^+$. Амплитуда медленной фазы восстановления с увеличением концентрации ионов хрома

повышалась, что возможно свидетельствует об увеличении скорости циклического электронного транспорта.

Опыты с использованием различных световых режимов показали, что активность ФС II у микроводорослей, выращенных в режиме день/ночь была более чувствительна к действию хрома, чем активность микроводорослей, выращенных при непрерывном освещении. Это показывает, что цикл день/ночь, используемый для водорослевых культур уменьшает способность клеток регулировать действие хрома на активность ФС II т.е. световой режим может влиять на токсичный отклик по отношению к хрому, что важно учитывать при проведении биотестирования.

Таблица 3. Параметры индукции флуоресценции микроводоросли *P. tricornutum* после 24 ч инкубации $K_2Cr_2O_7$ (2,5; 5; 10; 15; 25 мг/л). В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий принят за $P<0,05(*)$. % – процентное изменение от контроля.

Параметр	Контроль	Концентрация $K_2Cr_2O_7$, мг/л				
		2,5	5	10	15	25
Φ_{E_0}	0,36 (100%)	0,29* (81%)	0,30* (83%)	0,31* (86%)	0,28* (78%)	0,27* (75%)
PI_{ABS}	0,74 (100%)	0,39* (53%)	0,41* (55%)	0,40* (54%)	0,33* (45%)	0,29* (39%)
DI_0/RC	1,2 (100%)	1,4* (117%)	1,7* (142%)	1,8* (150%)	1,8* (150%)	1,8* (150%)
V_K	0,10 (100%)	0,11* (110%)	0,12* (120%)	0,12* (120%)	0,13* (130%)	0,14* (140%)

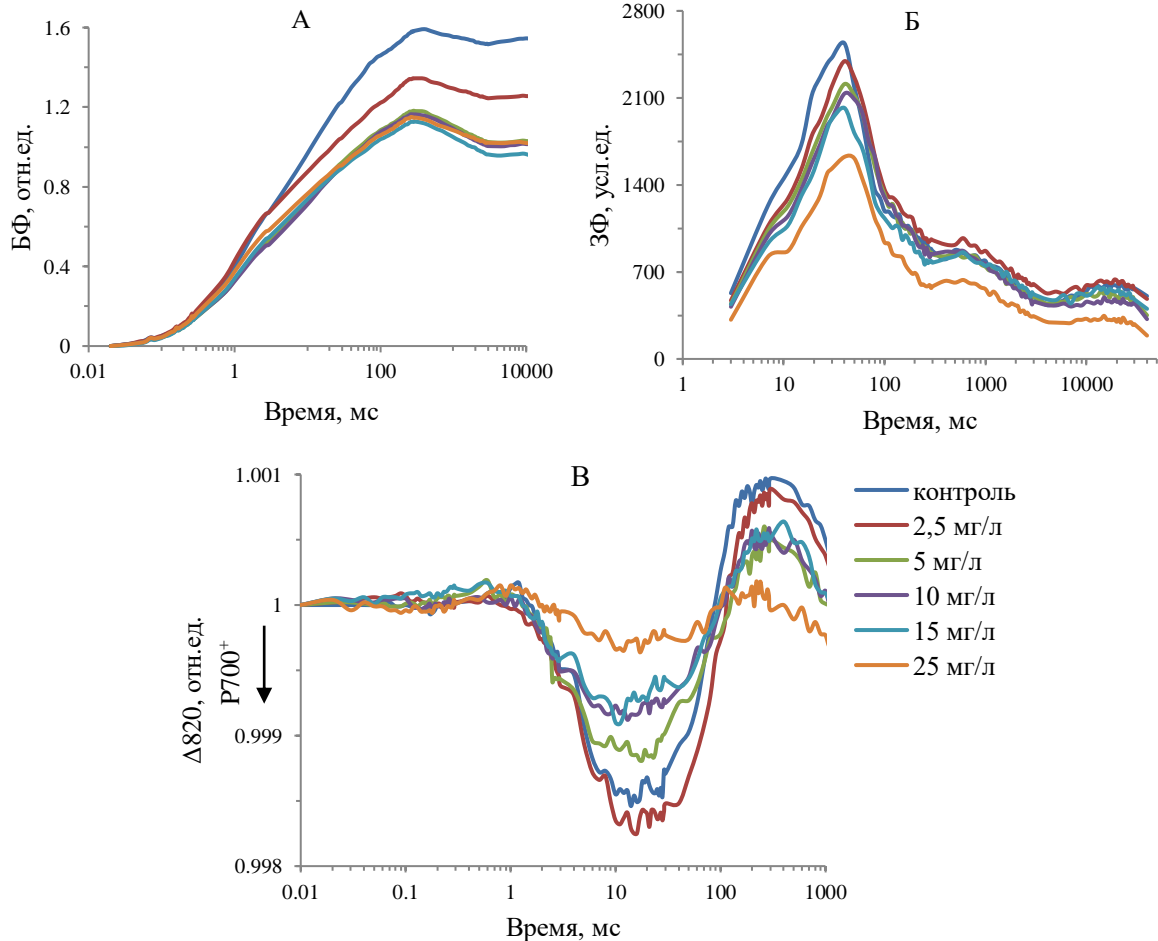


Рисунок 6. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (А), замедленной флуоресценции (Б) и кинетики окисления и восстановления P700 (В) у микроводоросли *P. tricornutum* при действии различных концентраций $K_2Cr_2O_7$ в течение 24 ч. Быстрая флуоресценция нормирована на F_0 . Интенсивность действующего красного света $1300 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Таким образом, полученные данные показали, что хромат-ионы могут сильно ингибировать скорость роста и процессы фотосинтеза морской микроводоросли *P. tricornutum*.

3.3. Изменение устойчивости микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* при добавлении гуминовых веществ в присутствии ионов хрома

При сравнении изменений параметров флуоресценции в присутствии ионов хрома у пресноводной микроводоросли *S. quadricauda* и морской микроводоросли *P. tricornutum* наблюдали аналогичные сайты воздействия на процессы фотосинтеза. Добавление ГВ к микроводорослям, обработанными ионами хрома, приводило к восстановлению параметров флуоресценции практически до уровня контроля (Таблица 4). При этом ГК проявляли больший защитный эффект, по сравнению с ФК. Обобщающий параметр PI_{ABS} , являющийся показателем функциональной активности ФС II также имел низкий показатель у обработанных хромат-ионами микроводорослей и повышался в присутствии ГВ, в особенности в присутствии ГК черноземных почв, который при малых концентрациях ионов хрома (2,5 мг/л) достигал уровня контроля.

Таблица 4. Параметры быстрой флуоресценции микроводоросли *S. quadricauda* при действии ионов хрома (2,5 мг/л) и ионов хрома с добавлением ГК и ФК черноземных почв (10 мг/л). В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий принят за $P<0,05(*)$. % – процентное изменение от контроля.

Параметр	Контроль	Хром	Хром +ФК	Хром +ГК
F_V/F_M	0,57 (100%)	0,44* (77%)	0,54 (95%)	0,55 (96%)
F_V/F_0	1,34 (100%)	0,78* (58%)	1,17 (87%)	1,22 (91%)
Φ_{E_0}	0,35 (100%)	0,23* (66%)	0,32 (91%)	0,34 (97%)
PI_{ABS}	0,95 (100%)	0,28* (29%)	0,72* (76%)	0,91 (96%)

ГК проявили больший защитный эффект, по сравнению с ФК, по-видимому, из-за относительной обогащенности структуры ГК ароматическими фрагментами (Куликова Н.А., 2010). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о защитном эффекте ГВ в присутствии ионов хрома у микроводоросли *S. quadricauda*.

3.4. Влияние наноалмазов детонационного синтеза на световые реакции фотосинтеза микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*

Несмотря на то, что промышленное производство наноалмазов детонационного синтеза (ДНА) исчисляется десятками тысяч тонн в год, литературных данных по влиянию ДНА на микроводоросли достаточно мало. С помощью флуоресцентных методов впервые были проведены эксперименты по влиянию ДНА на пресноводные микроводоросли *S. quadricauda*.

Как показали результаты экспериментов, ДНА в концентрации 15 мг/л, ингибировали рост микроводоросли *S. quadricauda* почти в 2 раза. ДНА нарушали реакции фотосинтеза, что проявлялось в снижении параметра F_V/F_M , который представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичной коэффициенту полезного действия. При действии ДНА происходило снижение потока электронов (Φ_{E_0}) от ФС II к пулу пластохинона (Рисунок 7). Следовательно, одно из первых мест воздействия ДНА локализовано на акцепторной части ФС II. При этом ДНА не продемонстрировали значительных изменений в эффективности КВК (F_V/F_0). Таким образом, ДНА не оказывали значительного влияния на донорный участок ФС II. В присутствии ДНА параметр V_J увеличился на 20 %, что указывает на увеличение доли Q_B невосстанавливающихся РЦ от ФС II. Параметр V_I - индикатор состояния редокс-состояния пула пластохинона (PQ) в темноте показал, что ДНА практически не влияли на наличие окисленных молекул PQ сайта Q_B .

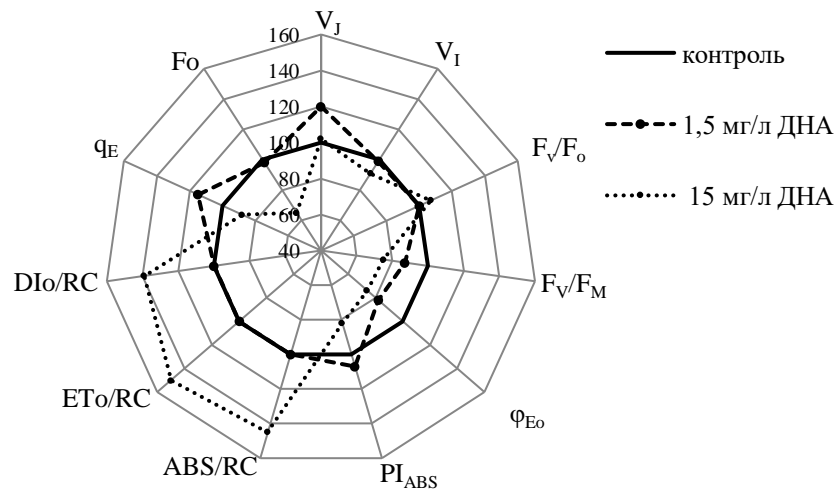


Рисунок 7. Паутинная диаграмма параметров ОЛР кинетики флуоресценции индукционных кривых микроводоросли *S. quadricauda* при действии ДНА (1,5; 15 мг/л) через 24 ч инкубации.

Обобщающий параметр PI_{ABS} в присутствии ДНА был снижен, что говорит о снижении функциональной активности ФС II у клеток микроводоросли. Это происходит из-за снижения доли активных РЦ и повышения тушения возбужденных состояний в антенне. Снижение доли активных РЦ привело к увеличению размера светособирающей антенны (ABS/RC). Снижение активных РЦ и квантовой эффективности переноса электронов от Q_A^- (Φ_{E_0}) приводит к нарастанию нефотохимических потерь (DI_0/RC) и увеличению потока электронов, переносимых через один активный реакционный центр (ET_0/RC). Это коррелирует с увеличением ΔpH -зависимого нефотохимического тушения q_E . Полученные данные показали, что ДНА ингибируют процессы фотосинтеза микроводоросли *S. quadricauda*.

3.5. Влияние наноалмазов детонационного синтеза на световые реакции фотосинтеза растений пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии гуминовых веществ

Исследования по влиянию ДНА на световые реакции фотосинтеза высших растений ранее не проводились. При исследовании влияния ДНА на высшие растения удалось зарегистрировать изменения в индукционных кривых флуоресценции при освещении высокой интенсивности ($5000 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) (Рисунок 8, Таблица 5). Добавление ДНА привело к снижению вклада фотохимической фазы J-I-P, что указывает на снижение потока электронов от ФС II к пулу пластохинона (P_{680}). Следовательно, одно из первых мест воздействия ДНА локализовано на акцепторной стороне ФС II. ДНА не продемонстрировали значительных изменений в эффективности КВК растений пшеницы *Triticum aestivum* L. Другими словами они не влияли на донорный участок ФС II. Это подтверждает такой параметр флуоресценции как F_v/F_0 (Таблица 5). ГК реки Суванни снижали влияние ДНА на параметры кривой индукции флуоресценции, в то время как эффект ФК реки Суванни не был столь выраженным. Это возможно связано с большим количеством функциональных групп у ГК в отличие от ФК. При этом сами ГВ не оказывали влияние на протекание световых реакции фотосинтеза растений пшеницы *Triticum aestivum* L.

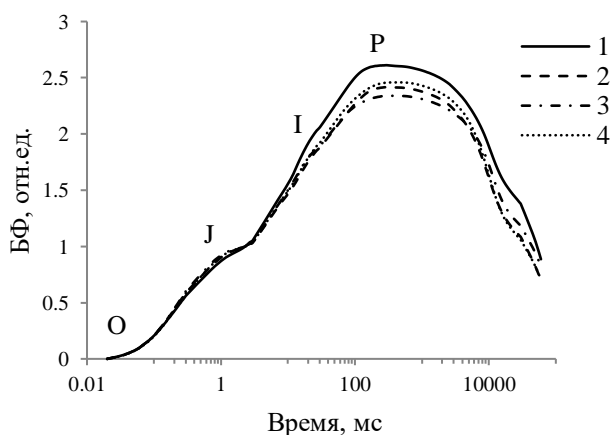


Рисунок 8. Влияние ДНА в концентрации 15 мг/л и ГВ реки Суванни в концентрации 50 мг/л на кинетики индукционных кривых быстрой флуоресценции листьев пшеницы *Triticum aestivum* L. Интенсивность флуоресценции нормирована к флуоресценции при 2 мс. 1 – контроль, 2 – ДНА, 3 – ДНА + ФК реки Суванни, 4 – ДНА + ГК реки Суванни.

В нашем эксперименте P_{ABS} был значительно снижен в присутствии ДНА, что указывает на их негативное влияние на фотосинтетические процессы растений при высоком освещении. При этом наблюдалось отсутствие смягчающего эффекта со стороны ФК, а снижение токсичности ДНА было продемонстрировано в присутствии ГК (Таблица 5). ДНА вызвали 25% снижение величины быстрой фазы индукции кинетики ЗФ в интервале времени от 10 до 100 мс, которое зависит от формирования электрохимических потенциалов на тилакоидной мембране. Изучение редокс-переходов P700, пигмента ФС I, при помощи М-РЕА - 2, показали отсутствие влияния ДНА на реакции ФС I.

Таблица 5. Параметры кинетики ОИР индукционных кривых флуоресценции листьев пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии ДНА (15 мг/л) и ГВ реки Суванни (50 мг/л). В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий принят за $P<0,05(*)$. % – процентное изменение от контроля.

Параметр	Контроль	ДНА	ДНА+ФК	ДНА+ГК
F_v/F_m	0,79 (100%)	0,75 (95%)	0,76 (96%)	0,77 (97%)
PI_{ABS}	2,2 (100%)	1,7* (77%)	1,7* (77%)	1,9* (86%)
F_v/F_o	3,8 (100%)	3,5 (92%)	3,6 (95%)	3,7 (97%)
Φ_{E_0}	0,49 (100%)	0,45 (92%)	0,46 (94%)	0,47 (96%)

Влияние ДНА и ГВ на растения пшеницы *Triticum aestivum* L. были также изучены с помощью основных параметров световых кривых флуоресценции хлорофилла. Выяснилось, что ДНА мало влияли на скорость электронного транспорта ($rETR$) проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при освещении в физиологических пределах. Однако, в присутствии ДНА наблюдалось уменьшение коэффициента утилизации световой энергии (α) и коэффициента светового насыщения (E_k), вычисленных из световых кривых электронного транспорта. Очевидно, это демонстрирует то, что токсичное действие ДНА на фотосинтез проявляется при избытке фотосинтетической активной радиации и указывает на возможное повреждение электронного транспорта в растениях в присутствии ДНА.

Совместно с сотрудниками факультета почвоведения и химического факультета МГУ были проведены дополнительные исследования по взаимодействию ДНА с ГВ. При добавлении ГВ в суспензию с ДНА средний диаметр частиц ДНА смещался к меньшему размеру. Все исследованные ГВ вызвали изменение знака заряда с положительного на отрицательный. Сопоставление данных по физико-химическим характеристикам ГВ и изменению дзета-потенциала ДНА в присутствии ГВ показало, что существует значительная положительная связь между дзета-потенциалом и атомным соотношением Н/С ($r = 0,86$) и О/С ($r = 0,81$). Это указывает, вероятно, на снижение коллоидной стабильности ДНА в присутствии ГВ, обогащенными алифатическими фрагментами и кислородом.

Для исследования возможного поглощения ДНА растениями, использовали ДНА, меченные тритием (Badun G.A. et al., 2014). Результаты показали, что ДНА активно проникают в корни растений и частично в побеги (Chernysheva M.G. et al., 2016; Kulikova N.A. et al., 2016). Содержание ДНА в корнях было намного выше, чем в стеблях и в листьях, что указывает на преимущественное накопление ДНА в корнях по сравнению с побегами. Адсорбция на поверхности корня, в свою очередь, должна быть тесно связана со стабильностью суспензии ДНА. Последнее связано с дзета-потенциалом ДНА, зависящего от наличия ГВ. Корреляционный анализ выявил значимую зависимость (коэффициент корреляции $r = 0,90$) содержания ДНА в корнях от дзета-потенциала ДНА. Таким образом, наблюдаемая корреляция позволила предположить, что дзета-потенциал является ключевым фактором, определяющим связывание ДНА с корнями растений. Данное явление, возможно, объясняется отрицательно заряженной поверхностью корня, что предотвращает адсорбцию отрицательно заряженных частиц ДНА в присутствии ГК. Это предположение хорошо соответствует продемонстрированному влиянию дзета-потенциала на их содержание в корнях: чем меньше по модулю величина отрицательного дзета-потенциала, тем выше содержание ДНА.

Таким образом, наши измерения показали, что ДНА не влияют на ФС I растений пшеницы, но могут оказывать негативное влияние на реакции ФС II, при повышенной интенсивности света. При взаимодействии ДНА с ГК произошла стабилизация дзета - потенциала (более 30 МВ по модулю). В отличие от этого, при взаимодействии с ФК, суспензии ДНА имели меньшее (по модулю) значение дзета-потенциала, что может свидетельствовать об их более низкой коллоидной стабильности и к усилению поглощения ДНА проростками пшеницы в присутствии ФК по сравнению с ГК.

3.6. Влияние наночастиц серебра на микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* и изменение их устойчивости при разных режимах добавления гуминовых веществ

НЧ серебра широко используются в медицине, текстиле, красках, в качестве пищевых добавок, упаковочной тары для продуктов питания. Нами были проведены исследования по влиянию НЧ серебра на параметры быстрой флуоресценции зеленой микроводоросли *S. quadricauda*. При высоких концентрациях НЧ серебра ингибировали эффективность фотосинтеза (F_v/F_m) микроводоросли (Таблица 6). НЧ серебра воздействовали на акцепторную часть ФС II, о чем свидетельствует увеличение параметра V_J . Накопление Q_B -невосстанавливаемых центров приводило к снижению эффективности (Φ_{E_0}) транспорта электронов ФС II.

Таблица 6. Параметры ОЛР индукционных кривых флуоресценции микроводоросли *S. quadricauda* при действии различных концентраций (0,01; 0,1; 1, 10 мг/л) НЧ серебра через 24 ч инкубации. В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий принят за $P<0,05$ (*).% – процентное изменение от контроля.

Параметр	Контроль	0,01 мг/л	0,1 мг/л	1 мг/л	10 мг/л
F_v/F_m	0,70 (100%)	0,70 (100%)	0,68 (97%)	0,62 (89%)	0,27* (39%)
V_J	0,14 (100%)	0,15 (107%)	0,19* (135%)	0,21* (150%)	0,23* (164%)
Φ_{E_0}	0,61 (100%)	0,59 (97%)	0,58 (95%)	0,41* (67%)	0,19* (31%)
PI_{ABS}	23 (100%)	21 (91%)	14* (61%)	7,6* (33%)	2,4* (10%)
ABS/RC	0,32 (100%)	0,34 (106%)	0,41* (128%)	0,54* (168%)	0,81* (253%)
DI_0/RC	0,09 (100%)	0,1 (111%)	0,16* (177%)	0,21* (233%)	0,29* (322%)

Отмечено значительное снижение индекса производительности PI_{ABS} у микроводоросли *S. quadricauda*, обработанных НЧ серебра. Низкие показатели параметра PI_{ABS} указывают на низкую функциональную активность ФС II (Таблица 6). Это происходит из-за снижения доли активных РЦ, что приводит к увеличению размера светособирающей антенны (ABS/RC) и повышению тушения возбужденных состояний

в светособирающей антенне. Уменьшение эффективности передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на РЦ сопровождается увеличением рассеивания неиспользуемой световой энергии (DI_0/RC).

В настоящее время ведется поиск новых препаратов на основе синтеза ГВ с различными НЧ. Поэтому на химическом факультете профессором Перминовой И.В. впервые был реализован синтез НЧ серебра в среде ГВ. Нами был проведен сравнительный анализ параметров флуоресценции микроводоросли *S. quadricauda* в присутствии НЧ серебра; НЧ серебра с добавлением ГВ и НЧ серебра, синтезированных с ГВ.

НЧ серебра при суточном контакте с микроводорослями нарушают реакции фотосинтеза, что выражается в снижении параметра F_V/F_M (Таблица 7). При добавлении ГВ к НЧ серебра наблюдали детоксицирующий эффект: параметр F_V/F_M , а также другие параметры приближались к значению контроля (Таблица 7). В тоже время у НЧ серебра, синтезированных с ГВ наблюдается резкое ингибирование реакции фотосинтеза.

Таблица 7. Параметры ОЛР кинетики флуоресценции индукционных кривых микроводоросли *S. quadricauda* при влиянии НЧ серебра; НЧ серебра в сочетании с ГК и ФК угля; НЧ серебра, синтезированные с ГВ угля через 24 ч инкубации. Концентрация НЧ серебра – 4·мг/л, ГВ – 10 мг/л. В таблице представлена медиана выборки при $n=5$, уровень значимости отличий принят за $P<0,05$ (*).% – процентное изменение от контроля.

Параметр	Контроль	НЧ серебра	НЧ серебра и ГВ		НЧ серебра, синтезированные с ГВ
			НЧ серебра+ГК	НЧ серебра+ФК	
F_V/F_M	0,71 (100%)	0,60* (85%)	0,69 (97%)	0,67 (94%)	0,2* (28%)
V_J	0,64 (100%)	0,87* (136%)	0,69 (108%)	0,78* (122%)	0,95* (148%)
ABS/RC	8,7 (100%)	11* (126%)	9,1 (105%)	10,7 (123%)	25* (287%)
DI_0/RC	2,6 (100%)	4,4* (169%)	2,8 (108%)	2,9* (112%)	8,9* (342%)
PI_{ABS}	0,16 (100%)	0,09* (56%)	0,14 (88%)	0,13* (81%)	0,01* (6%)*
Φ_{E_0}	0,25 (100%)	0,24 (96%)	0,25 (100%)	0,24* (96%)	0,03* (12%)

При сравнении токсического эффекта НЧ серебра и НЧ серебра, синтезированных с ГВ, максимальное ингибирующее воздействие оказали НЧ серебра, синтезированные с ГВ. Возможно, высокий токсический эффект НЧ серебра, синтезированных с ГВ, связан с формированием поверхностного слоя ГВ на НЧ серебра. Это может способствовать улучшению сорбции НЧ на поверхности водорослевой клетки. Также причиной может послужить разрушение системы сконденсированных ароматических колец, в результате синтеза НЧ серебра, отвечающих за связывание токсикантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Функционирование фотосинтезирующих организмов определяет существование почти всех экологических систем на Земле. Основу растительной клетки составляют световые процессы фотосинтеза, в которых происходит фиксация солнечной энергии. Зеленый пигмент - хлорофилл *a*, находящийся в фотосинтетических мембранах, помимо сбора световой энергии может служить природным датчиком состояния клеток фотосинтезирующих организмов. При нарушении состояния клеток под воздействием неблагоприятных условий происходят изменения флуоресценции хлорофилла, которые и служат источником информации.

В работе при одновременной регистрации индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния P700 удалось выявить первичные сайты действия ионов хрома и современных наноматериалов - НЧ алмаза и серебра, а также ГВ на световые процессы фотосинтеза микроводорослей. Анализ индукционных кривых показал, что одно из первых мест воздействия этих соединений локализовано на акцепторной части ФС II между акцепторами Q_A и Q_B (Рисунок 9). Это выражалось в изменении таких параметров, как максимальная фотохимическая эффективность ФС II (F_v/F_m), электронный транспорт (Φ_{E0}), индекс производительности (PI_{ABS}). В то же время реакции ФС I, связанной с восстановлением НАДФ, мало изменялась при действии этих соединений. Следует отметить, что с использованием чувствительных флуоресцентных методов удалось зарегистрировать воздействие ДНА на интактных растениях пшеницы и стимулирующее воздействие ГВ на первичные процессы фотосинтеза. Эти результаты позволяют рекомендовать параметры индукционных кривых флуоресценции хлорофилла для оценки устойчивости фототрофных организмов к действию современных токсикантов и препаратов ГВ при разработке экологически обоснованных норм воздействия деятельности человека на окружающую среду. Флуоресцентные методы обладают высокой чувствительностью, производительностью, точностью и позволяют проводить измерения состояния фотосинтетического аппарата *in situ* в режиме реального времени, что очень важно для решения экологических проблем.

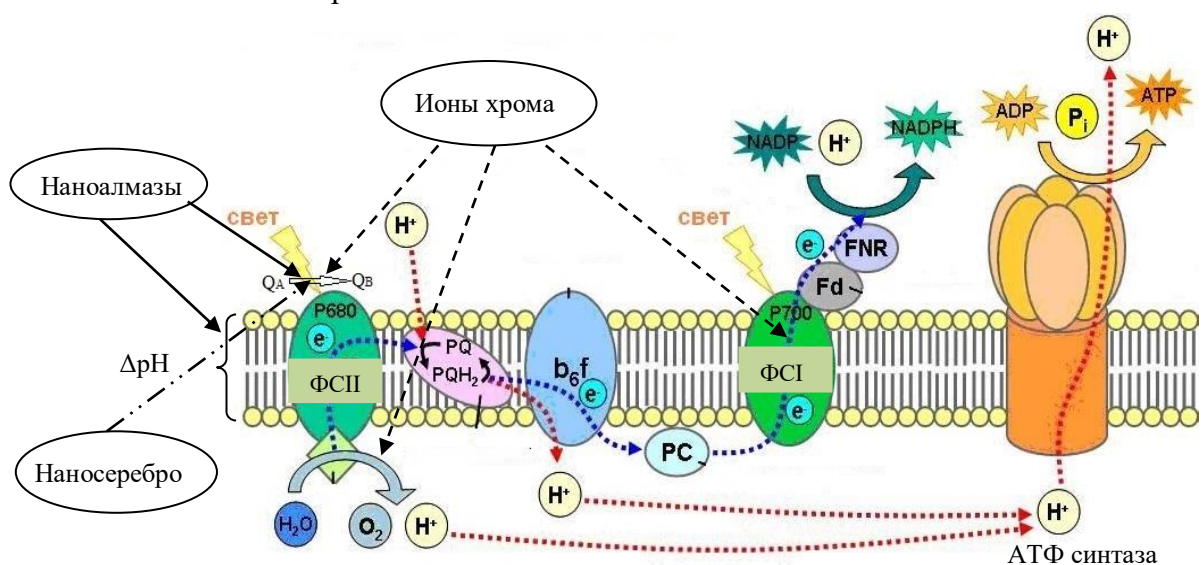


Рисунок 9. Схема действия ионов хрома, наночастиц серебра и алмаза на реакции фотосинтеза. ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, Q_A и Q_B – первый и второй акцепторы ФС II, P₆₈₀ – Хл реакционного центра ФС II, PQ и PQH₂ – пластохинон и

восстановленный пластохинон, комплекс цитохрома *b6f*, PC-пластоцианин, FeS – связанный железо-серный акцептор ФС I, P₇₀₀ – Хл реакционного центра ФС I, Fd – растворимый ферредоксин, FNR – ферредоксин-НАДФ-редуктаза.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено стимулирующее влияние гуминовых веществ (ГВ) на световые реакции фотосинтеза в концентрации 10 мг/л. Стимулирующее воздействие ГВ проявлялось в увеличении скорости роста и реакций фотосистемы II (ФС II), ответственной за выделение O₂ и разложение H₂O. Установлено изменение таких параметров флуоресценции в ФС II, как максимальный квантовый выход (F_v/F_m), индекс производительности (PI_{ABS}), электронный транспорт (φ_{Е0}), эффективность кислородвыделяющего комплекса (F_v/F₀). Обнаружено влияние ГВ на фотосинтетические мембраны клеток.

2. Установлено, что ионы хрома, начиная уже с минимальной концентрации (2,5 мг/л), снижают скорость роста и ингибируют электронный транспорт в ФС II на уровне акцепторов Q_A у микроводоросли *P.tricornutum* и *S. quadricauda*. Наблюдалось уменьшение квантового выхода электронного транспорта в ФС II (φ_{Е0}), индекса производительности (PI_{ABS}) и замедление восстановления пигмента P700, а также увеличение квантовой эффективности рассеивания световой энергии в антенном комплексе (DI₀/RC). В присутствии ионов хрома обнаружена активация циклического транспорта. Наиболее чувствительным параметром оказался PI_{ABS}, который можно предложить для обнаружения появления хромат-ионов в среде на ранних стадиях токсического воздействия. Обнаружено увеличение устойчивости микроводорослей к действию хрома при добавлении ГК.

3. Обнаружено, что ДНА проявляют токсичность по отношению к растениям пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях повышенного освещения, что ведет к ингибированию переноса электрона между Q_A и Q_B и нарушению формирования трансмембранного потенциала. Использование ДНА, меченных тритием позволило обнаружить увеличение содержания ДНА в корнях и листьях растений пшеницы *Triticum aestivum* L. Добавление ГК привело к снижению поглощения ДНА. Наблюдаемый феномен, вероятно, связан с влиянием ГК на дзета-потенциал ДНА, который поменялся с положительной формы на отрицательный. При воздействии ДНА на микроводоросли *S. quadricauda* токсический эффект наблюдался уже при минимальной концентрации ДНА (1,5 мг/л).

4. Установлено, что НЧ серебра, при концентрации 10 мг/л, после 3 часов инкубации вызвали нарушения в протекании световых реакции фотосинтеза микроводоросли *S. quadricauda*. НЧ серебра влияли на акцепторную часть ФС II, о чем свидетельствует снижение эффективности транспорта электронов ФС II (φ_{Е0}). Отмечено значительное снижение индекса производительности PI_{ABS} у микроводоросли *S. quadricauda*, обработанной НЧ серебра по сравнению с контролем. После суточной инкубации данный эффект наблюдался при концентрации 0,1 мг/л. При добавлении ГВ в растворы НЧ серебра, наблюдался детоксифицирующий эффект. Установлено, что НЧ серебра, синтезированные с ГВ обладали повышенной токсичностью. По-видимому, данный эффект связан с разрушением системы сконденсированных ароматических колец, отвечающих за связывание токсикантов.

5. Выявлены наиболее чувствительные параметры индукции флуоресценции (F_{ABS} , F_{E} , $F_{\text{V}}/F_{\text{O}}$), которые могут быть рекомендованы для оценки устойчивости фототрофных организмов к действию современных токсикантов и препаратов ГВ, при разработке экологически обоснованных норм воздействия деятельности человека на окружающую среду.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ (15):

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Габбасова, Д.Т.** Воздействие гуминовых веществ на световые реакции фотосинтеза зеленых микроводорослей / **Д.Т. Габбасова**, Д.Н. Маторин, Л.Б. Братковская, А.А. Алексеев // Агрохимический вестник. – 2018. – № 1. – С. 56–59.
2. **Gabbasova, D.T.** Effect of chromate ions on marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum* / **D.T. Gabbasova**, D.N. Matorin, I.V. Konyukhov, N.K. Seifullina, B.K. Zayadan // Microbiology. – 2017. – V. 86. – № 1. – P. 64–72.
3. Chernysheva, M.G. Humic substances alter the uptake and toxicity of nanodiamonds in wheat seedlings / M.G. Chernysheva, I.Yu. Myasnikov, G.A. Badun, D.N. Matorin, **D.T. Gabbasova**, A.I. Konstantinov, V.I. Korobkov, N.A. Kulikova // Journal of Soils and Sediments. – 2016. – P. 1–12.
4. Маторин, Д.Н. Использование световых кривых флуоресценции хлорофилла для исследования токсического действия синтетических наноалмазов на зеленые водоросли / Д.Н. Маторин, **Д.Т. Габбасова**, С.Н. Горячев, М.В. Иванов, В.Ю. Пономарев, А.А. Алексеев // Естественные и технические науки. – 2016. – № 5. – С. 30–32.
5. Маторин, Д.Н. Действие гуминовых веществ и наночастиц серебра и золота на флуоресценцию микроводоросли / Д.Н. Маторин, **Д.Т. Габбасова**, С.Н. Горячев, М.В. Иванов, В.Ю. Пономарев, А.А. Алексеев // Естественные и технические науки. – 2014. – № 7. – С. 31–33.

В других изданиях:

1. **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.
2. **Габбасова, Д.Т.** Изучение влияния бихромата калия на морские микроводоросли *Phaeodactylum tricorutum* / **Д.Т. Габбасова**, Д.Н. Маторин, А.А. Алексеев, Н.П. Тимофеев // Конференция. КИМО-2017. – Москва, 2017. – С.334–335.
3. Matorin, D.N. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll

fluorescence and P700 reaction in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* / D.N. Matorin, I.V. Perminova, **D.T. Gabbasova**, S.N. Goryachev, M.V. Ivanov, A.A. Alekseev // Proceedings of the 3rd International Symposium "Nanomaterials and the Environment". – Moscow, 2016. – P. 64.

4. **Габбасова, Д.Т.** Исследование воздействия бихромата калия на водные растения *L. gibba* с использованием флуоресцентного метода / **Д.Т. Габбасова**, Н.П. Тимофеев, Ф.Ф. Протопопов, С.Н. Горячев, П.С. Венедиктов // Сборник тезисов докладов конференции Математика Компьютер Образование 2016. – Т. 23. – Москва, 2016. – С. 118.

5. Протопопов, Ф.Ф. Изучение токсического действия тяжелых металлов на микроводоросли с использования импульсного флуориметра М-РЕА-2 / Ф.Ф. Протопопов, Н.П. Тимофеев, **Д.Т. Габбасова**, Д.А. Тодоренко, А.А. Алексеев, Д.Н. Маторин // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Морские биологические исследования: достижения и перспективы", приуроченная к 145-летию Севастопольской биологической станции, 19-24 сентября 2016. – Т. 3. – г. Севастополь, 2016. – С. 194–197.

6. Мясников, И.Ю. Поступление наноалмазов в проростки пшеницы и их влияние на фотосинтез / И.Ю. Мясников, М.Г. Чернышева, Г.А. Бадун, В.И. Коробков, А.И. Константинов, **Д.Т. Габбасова**, Д.Н. Маторин, Н.А. Куликова // Сборник тезисов докладов 10 Международной конференции Углерод: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, технология. – Москва, г. Троицк, 2016. – С. 294–295.

7. **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: Материалы международного симпозиума и школы, МГУ, 25–28 октября 2016 г. – М.: ГЕОС, 2016. – С. 328–330.

8. **Габбасова, Д.Т.** Исследование характеристик микроводорослей методом индукции флуоресценции хлорофилла *a* / **Д.Т. Габбасова**, Д.Н. Маторин, Л.Б. Братковская, А.А. Алексеев // V съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, Россия, 2015. – С. 364.

9. **Габбасова, Д.Т.** Действие гуминовых веществ и наночастиц серебра и золота на флуоресценцию культуры микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* / **Д.Т. Габбасова**, Ф.Ф. Протопопов, Б.К. Заядан // XXI Пушчинские чтения по фотосинтезу, Пушкино, Россия, 2015. – С. 30.

10. Тодоренко, Д.А. Исследование влияния наночастиц серебра на быструю и замедленную флуоресценцию хлорофилла *a* и на редокс состояние РЦ ФС I (P700) зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* / Д.А. Тодоренко, **Д.Т. Габбасова**, Ф.Ф. Протопопов, С.Н. Горячев, М.В. Иванов // Материалы докладов V съезда биофизиков России. – Т. 2 серия экологическая биофизика. – Ростов на Дону, Южный федеральный университет, 2015. – С. 377.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю Д.Н. Маторину за всестороннюю поддержку, компромиссное руководство, полезные замечания и идеи, за его доверие и терпение. Автор выражает благодарность и признательность за ценные рекомендации и помощь Н.А. Куликову. Автор благодарен М.Г. Чернышевой, Г.А. Бадун, Д.С. Волкову за помощь в получении физико-химических данных, И.В. Конюхову за помощь в проведении спектральных исследований.

Габбасова Дилара Тагировна (Российская Федерация)

Оценка воздействия потенциальных загрязнителей на световые реакции фотосинтеза в присутствии гуминовых веществ

Работа посвящена изучению влияния на световые реакции фототрофных организмов ионов хрома, наночастиц алмаза и серебра и определению изменению их устойчивости в присутствии гуминовых веществ.

Определены первичные сайты воздействия токсикантов – ионов хрома, наночастиц алмаза и серебра на микроводоросли. Выявлено воздействие наночастиц алмаза на растения пшеницы. Показано их проникновение в растения и влияние дзета-потенциала в присутствии гуминовых веществ.

Предложено использовать некоторые параметры индукции флуоресценции для оценки устойчивости фототрофных организмов к действию современных токсикантов и препаратов гуминовых веществ при разработке экологически обоснованных норм воздействия деятельности человека на окружающую среду.

Gabbasova Dilara Tagirovna (Russian Federation)

Assessment of the effects of potential pollutant on light reactions of photosynthesis in the presence of humic substances

The work is devoted to the study of the influence of chromium ions, diamond and silver nanoparticles on light reactions of phototrophic organisms and determination of their stability change in the presence of humic substances.

It was determined the primary sites of exposure of toxicants - chromium ions, diamond and silver nanoparticles to microalgae. It has been revealed the effect of nanodiamond on wheat plants. It was shown their penetration into plants and influence on Zeta potential in the presence of humic substances.

It is proposed to use some parameters of fluorescence induction to assess of the resistance of phototrophic organisms to the action of modern toxicants and drugs of humic substances in the development of environmentally sound standards of human impact on the environment.