

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Цзя Шуньчао

**Механизмы действия ионов серебра и меди на функциональное состояние
клеток фотосинтезирующих микроорганизмов**

1.5.2. Биофизика (биологические науки)

1.5.15. Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научный
руководитель:** **Рубин Андрей Борисович**, доктор биологических наук,
профессор, академик РАН

**Официальные
оппоненты:** **Терехова Вера Александровна**, доктор биологических наук,
профессор, Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, кафедра
земельных ресурсов и оценки почв, профессор

Кратасюк Валентина Александровна, доктор
биологических наук, профессор, Сибирский федеральный
университет, Институт фундаментальной биологии и
биотехнологии, кафедра биофизики, заведующая кафедрой

Олькова Анна Сергеевна – доктор биологических наук,
доцент, Вятский государственный университет, кафедра
экологии и природопользования, профессор

Защита диссертации состоится «19» июня 2025 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3433>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Загрязнение водных экосистем тяжелыми металлами, в частности медью и серебром, представляет серьезную экологическую проблему. Эти металлы в различных формах попадают в водную среду в результате различной антропогенной деятельности и могут оказывать токсическое воздействие на водные организмы (Olivia Spain, et al, 2021; Hao Li, et al. 2022; Филенко, 2007). Фотосинтезирующие микроводоросли являются одними из наиболее чувствительных компонентов водных экосистем к действию тяжелых металлов (Elena Cavalletti, et al. 2022). Мониторинг состояния популяций микроводорослей имеет большое значение для оценки экологического благополучия водных объектов (Маторин Д.Н. и др. 2010; Mengyuan Gu, 2022).

Для эффективного экологического мониторинга важно применять экспресс-методы, способные выявить токсическое влияние на ранних стадиях, до появления видимых признаков нарушений в экосистемах (Mengyuan Gu, 2022; Tingting Gan, et al. 2023). Классические методы, как правило, фиксируют уже произошедшие изменения и не всегда позволяют предотвратить негативные последствия. В этом отношении перспективным является использование биофизических методов, основанных на регистрации флуоресценции хлорофилла (Маторин Д.Н. и др. 2012; Tingting Gan, et al. 2023; Hanwant Singh, et al. 2022). Эти методы позволяют быстро и с высокой чувствительностью оценить состояние фотосинтетического аппарата микроводорослей, который является одной из первичных мишеней токсического действия тяжелых металлов (Заядан Б.К. и др. 2020; Giseli S. Rocha, et al. 2021; Li-Li Dong, et al. 2020).

Лабораторные исследования токсичности на модельных системах с использованием чувствительных маркерных организмов являются важным подходом для изучения механизмов действия загрязняющих веществ и прогноза их влияния на экосистемы (Elyssa G. Fawaz, et al. 2019). Микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* зарекомендовала себя как удобный модельный объект для таких исследований благодаря быстрому росту, чувствительности к различным токсикантам и хорошей изученности (Li-Li Dong, et al. 2020, Ruchi Acharya and Tayyab Saify 2012). Также, следует отметить, что культура *Scenedesmus quadricauda* является модельным тест-организмом, широко используемым в биотестировании и включена в методики определения токсичности вод, допущенных для целей государственного экологического контроля (Федеральный реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03223, <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293842/4293842245.htm>).

Токсическое действие меди на микроводоросли связано с нарушением структуры и функций клеточных мембран, ингибированием ферментов, генерацией активных форм кислорода (Liudmila V. Stelmakh, et al. 2022, Elena Cavalletti, et al. 2022, Wai-Kuan Yong, et al. 2018, Hui Wang, et al, 2017). На молекулярном уровне медь взаимодействует с белками, нуклеиновыми кислотами, глутатионом, другими клеточными компонентами, нарушая их функции (Jozef Kovacik, et al. 2010). Фотосинтетический аппарат также чувствителен к действию меди, что проявляется в изменениях содержания пигментов, снижении эффективности фотосинтеза, повреждении реакционных центров (Liudmila V. Stelmakh, et al. 2022; Giseli S. Rocha, et al. 2021; Tingting Gan, et al. 2023).

Серебро обладая известными антибактериальными свойствами также оказывает негативное воздействие и на различные организмы, в том числе и на водные фотосинтезирующие организмы. В частности, известно, что серебро может связывать водород в серосодержащих группах белков фотосинтезирующих организмов, изменяя их конформацию и инактивировать их (Ouzounidou, Constantinidou, 1999). Также отмечено взаимодействие с биомолекулами и молекулярными комплексами (Salisbury, Ross, 1991). Известно свойство серебра инактивировать антиоксидантные ферменты, в частности в результате повышенной генерации АФК. Также ионы этого металла способны снижать содержание хлорофилла и ингибировать фотосинтетические мембраны (Pell, Dann, 1991).

Другим важным фотосинтезирующими организмами водных экосистем являются цианобактерии или сине-зеленые водоросли, особенностями которых является большая адаптивность к стрессорным условиям и в частности к тяжелым металлам (Angela Mehta, et al. 2014; Luis López-Maury, et al. 2003), а также к способности адаптировать состав фотосинтетических пигментов к изменению спектрального состава светового излучения (David Fuente, et al. 2021). Хорошо изученным таким маркерным организмом является *Synechocystis sp. PCC 6803*.

Сравнительные исследования влияния токсикантов на различные по устойчивости к такому действию фотосинтезирующие акватические микроорганизмы являются полезными с точки зрения оценки действия этих загрязнителей на водные экосистемы.

Исследования с применением методов регистрации флуоресценции хлорофилла показали, что параметры этой флуоресценции, такие как максимальный квантовый выход ФСII (Fv/Fm), индекс производительности (PIABS), отношения потоков поглощения (ABS/CSM), захвата (TRo/CSM) и переноса электронов (ETo/CSM), относительной скорости линейного электронного транспорта (rETR) чувствительно реагируют на присутствие меди и серебра (Маторин Д.Н. и др. 2012; Tingting Gan, et al. 2023; Hanwant Singh, et al. 2023; Li-Li Dong, et al. 2020; Liudmila V. Stelmakh, et al. 2022). Характеристики ОЛР кривых флуоресценции позволяют анализировать состояние отдельных компонентов фотосинтетического аппарата и потоки энергии в нем (Mengyuan Gu, 2022). При относительно высоких концентрациях меди и серебра наблюдается снижение фотохимического и не фотохимического тушения флуоресценции, что может указывать на повреждение механизмов фотозащиты и на инактивацию реакционных центров ФСII (Giseli S. Rocha, et al. 2021), а также к морфологическим изменениям клеток (Ruchi Acharya and Taayab Saify 2012; R. Acharya, et al. 2014). Низкие же концентрации меди и серебра оказывают некоторое стимулирующее действие на клетки по разным параметрам (Ruchi Acharya and Taayab Saify 2012, Xiao-Ping Xu, et al. 2021), что может показывать на адаптацию клеток к действию, но не выявлять наличие ранних скрытых токсических проявлений. По всей видимости характер и механизмы влияния этих металлов на параметры флуоресценции у разных видов микроводорослей отличаются (Li-Li Dong, et al. 2020; Tingting Gan, et al. 2023). Обычно концентрация меди в природных водах составляет менее 32 нМ (Вишняков А.Н. и др. 2016), при этом при загрязнении эта концентрация может достигать значения 32 мкМ, что является токсичным для водных фотосинтезирующих организмов (Moore and Ramamoorthy, 1984). Значительное количество исследований по токсическому действию Cu было проведено при более высоких концентрациях (до 500 мкМ) (Baryla et al., 2000), которые значительно

превышают концентрации даже для сильно загрязненных сред (Moore and Ramamoorthy, 1984). Установленные ПДК серебра в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования составляют 0,05 мг/л (ГН 2.5.1.1315-03).

Большинство исследований с использованием измерений параметров флуоресценции на микроводорослях проведены на суспензиях клеток. В то же время известно, что индивидуальные клетки в суспензии отличаются друг от друга. Эти отличия, в частности, показаны для параметров первичных реакций фотосинтеза (Riznichenko G. Y., et al. 1996). Предположительно, что клетки в суспензии отличаются друг от друга и по чувствительности к токсикантам. В силу того, что действие меди и серебра приводит к тушению флуоресценции хлорофилла, при анализе данных флуоресценции в суспензиях может проявляться «ошибка выжившего», когда поврежденная часть клеток практически не видна в сигналах флуоресценции и маскируется сигналом флуоресценции от клеток с нормальными параметрами, которые проявили большую устойчивость к токсикантам. Поэтому для дальнейшего изучения механизмов повреждения фотосинтетического аппарата клеток ионами меди и серебра необходимы как комплексный подход с использованием различных чувствительных экспресс методов в суспензиях клеток, так и исследования на отдельных клетках.

Цели и задачи исследования

Целью исследования было определить характер изменения состояния фотосинтетического аппарата пресноводных фотосинтезирующих микроорганизмов под действием ионов Cu^{2+} и Ag^+ с использованием неинвазивных спектральных методов регистрации параметров флуоресценции хлорофилла тилакоидных мембран в суспензиях и на одиночных клетках.

В задачи исследования входило:

1. Исследовать влияния ионов меди и серебра на размножение клеток *Scenedesmus quadricauda* и их фотосинтетическую активность.
2. Изучить влияние ионов Cu^{2+} и Ag^+ на состояние пигментного аппарата микроводорослей с помощью неинвазивных спектральных методов.
3. Изучить влияние Cu^{2+} и Ag^+ на характер индукции флуоресценции хлорофилла *a* в суспензиях клеточных культур и в одиночных клетках водорослей и цианобактерий.
4. Исследовать характер линейного электронного транспорта (rETR) и нефотохимического тушения (NPQ) под действием Cu^{2+} и Ag^+ на клетки микроводорослей.
5. Изучить влияние Cu^{2+} и Ag^+ на затухание флуоресценции в клетках в пикосекундном диапазоне.

Положения, выносимые на защиту

Использование биофизического подхода, основанного на комплексе спектральных методов, позволяет изучить механизмы влияния ионов меди и серебра на ранних стадиях их воздействия на фотосинтетический аппарат микроорганизмов.

Для всесторонней оценки потенциального токсического воздействия меди и серебра необходимо использовать микромолярный интервал их концентраций, начиная от естественного уровня до уровня, характерного для сильно загрязненных водных экосистем.

Гетерогенный характер чувствительности клеток микроводорослей к действию токсикантов на их фотосинтетический аппарат возможно выявить с помощью

микрофлуориметрического анализа одиночных клеток, принадлежащих либо одной, либо различным таксономическим группам.

Отдельные таксономические группы водных фотосинтезирующих микроорганизмов, обладающие различной чувствительностью к действию токсикантов, дают соответствующий вклад в общее состояние экологической водной системы в различных условиях.

Научная новизна работы

Проведенный сравнительный анализ действия ионов меди и серебра на микроорганизмы разных таксономических групп — зелёную микроводоросль и цианобактерию — с использованием спектроскопии и анализа флуоресценции на популяционном уровне и одиночных клетках показал нарушение линейного транспорта электронов между компонентами электрон-транспортной цепи (ФСII, хиноны, пластохиноновый комплекс, цитохромный комплекс, ФСI), усиление защитных механизмов (нефотохимическое тушение).

Изучение индукции флуоресценции хлорофилла на одиночных клетках выявило гетерогенность их чувствительности к действию токсикантов, а также позволило обнаружить скрытое токсическое воздействие, не проявляющееся при исследовании суспензии клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа вносит вклад в понимание молекулярных и клеточных механизмов действия тяжёлых металлов на фотосинтетические микроорганизмы. Уточнены принципы взаимодействия ионов Cu^{2+} и Ag^+ с компонентами ФСII и фотозащитными механизмами. Исследование предоставляет новые данные о взаимосвязи между условиями освещения и токсическими эффектами металлов, что важно для понимания адаптационных механизмов фотосинтезирующих организмов. Развита представления о роли клеточной гетерогенности в оценке токсичности в популяциях микроорганизмов.

Полученные результаты и методологические подходы, апробированные в работе, могут быть использованы при разработке высокочувствительных экспресс методов экологического мониторинга загрязнений водных объектов тяжёлыми металлами и другими ксенобиотиками. Методология спектрального анализа флуоресценции одиночных клеток может быть адаптирована для ранней диагностики токсикантов в природных и искусственных экосистемах. Выявленные различия в устойчивости микроорганизмов к ионам металлов позволяют использовать *Synechocystis sp. PCC 6803* как модель устойчивости, а *Scenedesmus quadricauda* — как индикатор чувствительности в биотестировании.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в работе результатов подтверждается использованием современного оборудования и методик, относящихся к направлению экологической биофизики, а также использования современных программ и подходов статистической обработки полученных данных. Полученные результаты были доложены на международных конференциях. Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, из них 3 статьи в рецензируемых международных и отечественных журналах, входящих в поисковые базы данных: РИНЦ, Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора

Соискателем под руководством научного руководителя был разработан план работы, сформулированы цель и задачи исследования, а также самостоятельно осуществлён поиск и обработка научной литературы по теме диссертации. Спланированы и проведены эксперименты, соответствующие поставленным задачам, выполнены систематизация, структурирование и анализ полученных результатов. Самостоятельно изложены положения, выносимые на защиту, заключение и выводы. Основные положения и результаты исследования изложены в научных статьях, опубликованных соискателем в соавторстве. В статье [1] автором проведён анализ методов спектроскопии комбинационного рассеяния, применяемых в экологическом мониторинге различных загрязнений. Соискателю принадлежат разделы: 3.4.4, 3.4.9, 4.1.1, 4.1.4. В статье [2] соискателю принадлежат: гипотеза о влиянии ионов серебра при повреждении клеточных мембран наночастицами серебра; исследование спектральных свойств наночастиц серебра; анализ влияния про- и антиоксидантных факторов на повреждение клеточных мембран. Соискателю в этой статье принадлежат разделы: 3.1.1, 3.4. В статье [3] соискателю принадлежат: постановка цели и задач исследования, разработка и планирование схемы эксперимента, получение результатов по кинетике флуоресценции суспензий клеток микроводорослей и кинетике их роста. Соискателю в этой статье принадлежат разделы: 2.1, 2.3.1, 3.2, 3.5.

Объем и структура диссертации

Диссертация представлена в виде таких основных разделов как: введения с постановкой цели и задач исследования, обзор литературы, материалов и методов исследования, описания полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Объем представленной диссертации составляет – 243 страниц, в которые включены 60 рисунков, 7 таблиц и 299 источников международной и отечественной как современной, так и более ранней литературы.

Основное содержание работы

Введение

Во введении раскрыта актуальность темы диссертации и степень разработанности данной проблематики на сегодняшний день. В конце введения сформулированы цель и задачи данного исследования.

Обзор литературы

В разделе – «Обзор литературы» описаны основные известные факты, относящиеся к морфологическим и физиологическим особенностям используемых в работе объектов исследования: *Scenedesmus quadricauda* и *Synechocystis sp. PCC 6803*. В этом разделе представлены теоретические и особенности практического применения таких современных методов исследования как: спектральные методы в том числе различные методы анализа флуоресценции хлорофилла и метод комбинационного рассеяния света. Описаны известные на данный момент сведения о механизмах токсичности тяжелых металлов (меди и серебра) на акватические фотосинтезирующие микроорганизмы и влияние различных физико-химических факторов на эти биологические объекты по отдельности в сочетании с действием тяжелых металлов. Представлены известные в современной литературе сведения о применении модельных систем и модельных подходов в экологических исследованиях.

Материалы и методы

В главе «Материалы и методы» описаны методы культивирования объектов исследования и приготовления образцов, методы исследования, схема эксперимента и методы статистической обработки полученных данных.

Краткое описание раздела «Материалы и методы».

Культивирование клеток.

Зеленую хлорококковую микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* культивировали асептически на среде Успенского при $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и постоянном перемешивании (120 об/мин) при непрерывном освещении люминесцентными лампами при плотности фотосинтетического светового потока (Photosynthetic Photon Flux Density, PPDF) $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ в течение 4 дней; плотность клеток достигала $3\text{--}4 \times 10^6$ клеток мл^{-1} . Культивирование цианобактери - *Synechocystis* sp. PCC 6803 в стандартной среде BG-11 без добавления ЭДТА при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ и постоянном перемешивании (120 об/мин) при непрерывном освещении люминесцентными лампами при плотности фотосинтетического светового потока $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ в течение 7 дней, после чего плотность клеток достигала $8,5 \times 10^7$ клеток мл^{-1} . После культивирования перед экспериментом суспензии микроорганизмов разделяли на пробы объемом 15 мл.

Измерения абсорбции.

Спектры поглощения $A(\lambda)$ микроводорослей регистрировали в спектральном диапазоне 400-800 нм на ручном однолучевом спектрофотометре, оснащённом интегрирующей полостью для уменьшения ослабления света мутных образцов. Использовалась кварцевая кювета диаметром 1 см. В качестве источника света и детектора света использовали галогенную лампу и CCD-спектрометр (USB2000, Ocean Optics, США). Измерение абсорбции цианобактерий проводили на спектрофотометре SHIMADZU UV2600i (Япония). Изменения содержания хлорофилла и каротиноидов отслеживались *in vivo* с помощью спектров A_{678} и A_{480} , соответственно.

Схема эксперимента.

Клетки водорослей, взятые в средней логарифмической фазе роста, инокулировали в прозрачные пробирки объемом 15 мл со свежей средой. Содержание клеток корректировали до конечного значения абсорбции A_{678} 0,04 (примерно $1,5 \times 10^5$ клеток $\cdot \text{мл}^{-1}$), чтобы избежать самозатенения и реабсорбции флуоресценции. Затем образцы водорослей подвергали воздействию 0 (контроль), 0,1-10 мкМ CuSO_4 и 0,05-1 мкМ AgNO_3 в течение 2 и 24 ч. Одну группу пробирок держали в темноте, а другую на постоянном освещении при PPDF $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Концентрация цианобактерий в пробах составляла примерно $4,0 \times 10^7$ клеток $\cdot \text{мл}^{-1}$. При этом действии меди и серебра было в концентрациях 10-80 и 1-10 мкМ соответственно.

Исследование влияние меди и серебра на рост популяции микроводорослей.

Для исследования влияния ионов меди (0,1-10 мкМ) и серебра (0,05-1 мкМ) на рост культуры готовили образцы объемом 15 мл с концентрацией клеток $2,5 \times 10^5$ клеток $\cdot \text{мл}^{-1}$. Контрольные образцы и образцы с CuSO_4 и AgNO_3 помещали в климатостат с температурой $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и постоянном встряхивании (120 об/мин) при непрерывном освещении с PPDF $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Подсчет численности клеток в образцах проводили каждые сутки в течение 8-ми суток.

Измерения флуоресценции хлорофилла *a* в суспензии фотосинтезирующих клеток.

Кривые индукции флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*) регистрировали в суспензиях водорослей, адаптированных к темноте, с помощью флуорометра AquaPen-C AP-C 110 (Photon Systems Instruments, Чехия). PPDF и длительность вспышки синего актиничного света ($\lambda = 455$ нм) составляли $3000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и 2 с соответственно. Кинетику светоиндуцированной флуоресценции Хл *a* анализировали с помощью JIP-теста, предложенного (Strasser, Strasser, 1995; Strasser et al., 2004). Для исключения влияния меди и серебра на оптические свойства клеток, рассчитали специфичные для А*455 значения F_o (F^*o) и F_m (F^*m). Длина волны актиничного света для возбуждения флуоресценции у цианобактерий была - $\lambda = 620$ нм. Фотохимический квантовый выход — эффективность ФСII или относительную переменную флуоресценцию (F_v/F_m) регистрировали в суспензиях микроорганизмов, адаптированных к темноте (5 минут).

Индукционные кривые (переходные процессы) флуоресценции отдельных клеток.

Индукционные кривые флуоресценции отдельных клеток микроводорослей определяли с помощью микрофлуориметра с быстрой частотой повторения, описанного ранее (Kuznetsov et al., 2021). В каждом образце анализировали 50 адаптированных к темноте клеток. Для увеличения соотношения сигнал/шум применяли технику усреднения, когда для одной клетки регистрировали серию из 10 индукционных кривых (переходных процессов). Для экономии времени определяли только ОJ-фазу (0 – 1 мс) переходного процесса флуоресценции. Для каждой клетки получали начальное значение флуоресценции F_o и значение максимума флуоресценции в состоянии однократно сработавшего РЦ (одного оборота), которое обозначали как F_{st} . Фотохимический квантовый выход ФСII определяли следующим образом: $\Phi_{PSII} = (F_{st}-F_o)/F_{st}=\Delta F/F_{st}$. $\Phi_{PSII} = (F_{st}-F_o)/F_{st}=\Delta F/F_{st}$. $\Phi_{PSII} = (F_{st}-F_o)/F_{st}=\Delta F/F_{st}$.

Статистическая обработка данных.

Эксперименты проводили в 3-х сериях независимых экспериментов с минимумом в 3-х повторностях всех образцов. Обработка данных проводилась в программе Statistica (StatSoft, Inc. STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 13.3.704.19. 2025. <http://www.statsoft.com>). Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, признавая различия между средними значениями показателей значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Изучение влияния ионов меди и серебра на размножение клеток *Scenedesmus quadricauda* и их фотосинтетическую активность.

В этом исследовании применен существующий общепризнанный подход, используемый при мониторинге различных поллютантов. Мы исследовали влияние ионов меди и серебра на рост популяции клеток, их сухую массу, а также на эффективность их фотосинтетического аппарата, определяемую по параметру – относительная переменная флуоресценция (F_v/F_m).

На рисунке 1 представлены данные по влиянию ионов меди (А) и серебра (Б) на кинетику роста популяции *Scenedesmus quadricauda*.

Из рис.1А видно, достоверное отличие в количестве клеток в популяции при действии меди по сравнению с контролем наблюдается только при действии токсиканта лишь на 4-е

сутки при максимальной концентрации (10 мкМ). В более поздние сроки наблюдается дозозависимый эффект влияния меди на снижения роста количества клеток в популяции.

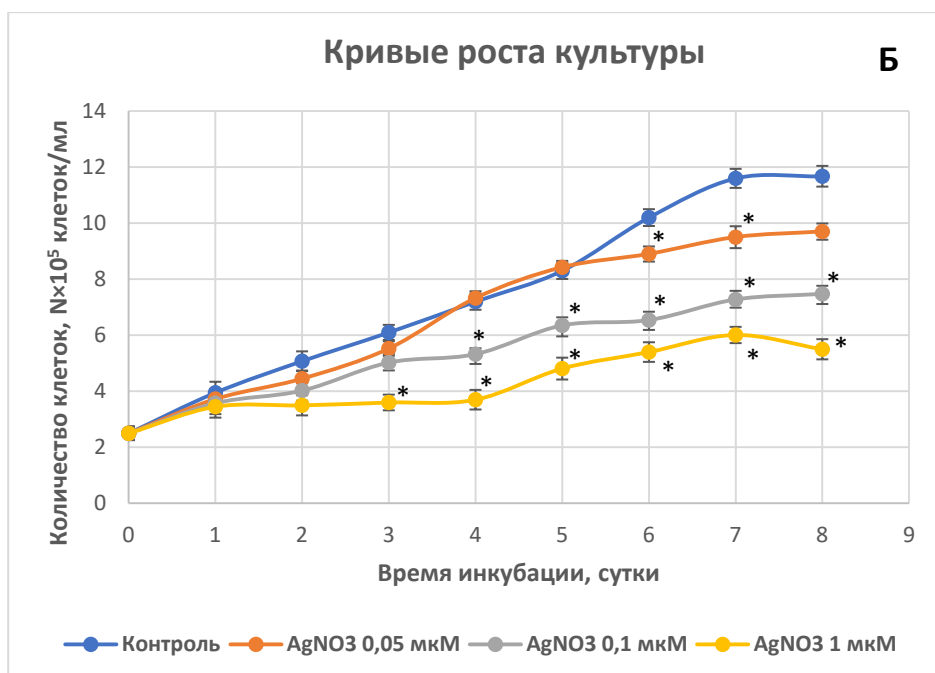
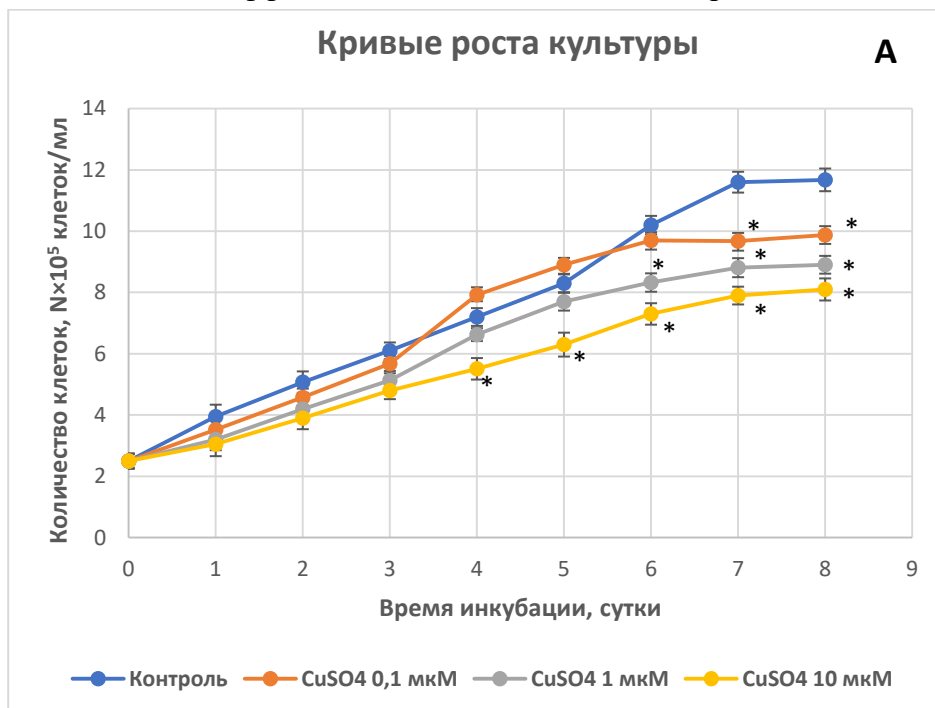


Рис.1. Влияние Cu^{2+} (А) и Ag^+ (Б) на рост популяции в суспензии культуры микроводоросли *S. quadricauda*. Инкубация клеток проводилась при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при температуре 24°C . * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

При действии серебра (рис.1Б) дозозависимый эффект снижения роста популяции оказался более выражен по сравнению с таковым для меди, даже при меньших концентрациях. Что указывает на большую токсичность серебра, которое, как мы предполагаем связано с более выраженной генерацией АФК при участии серебра.

Представленные в таблицах 1 и 2 данные по влиянию ионов меди и серебра, соответственно, на сухой остаток в экспериментальных образцах коррелируют с данными по

кинетики роста культур. Так при концентрации меди 10 мкМ наблюдается снижение роста, исследуемого параметра на 4-е сутки инкубации.

Таблица 1. Влияние ионов меди и времени инкубации на сухой остаток культуры *Scenedesmus quadricauda*. Масса сухого остатка представлена в виде средних значений в мг и их среднеквадратических ошибок.

Время, сутки	Контроль	CuSO ₄ 0,1 мкМ	CuSO ₄ 1 мкМ	CuSO ₄ 10 мкМ
0	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,063
1	1,975 ± 0,099	1,763 ± 0,088	1,603 ± 0,080	1,525 ± 0,076
2	2,538 ± 0,127	2,288 ± 0,114	2,099 ± 0,105	1,950 ± 0,098
3	3,050 ± 0,153	2,838 ± 0,142	2,565 ± 0,128	2,400 ± 0,120
4	3,600 ± 0,180	3,963 ± 0,198	3,313 ± 0,166	2,715 ± 0,138
5	4,150 ± 0,208	4,450 ± 0,223	3,850 ± 0,193	3,102 ± 0,158
6	5,100 ± 0,255	4,850 ± 0,243	4,163 ± 0,208	3,450 ± 0,183
7	5,800 ± 0,290	4,838 ± 0,242	4,405 ± 0,220	3,720 ± 0,198
8	5,838 ± 0,292	4,938 ± 0,247	4,453 ± 0,223	3,950 ± 0,203

Таблица 2. Влияние ионов серебра и времени инкубации на сухой остаток культуры *Scenedesmus quadricauda*. Масса сухого остатка представлена в виде средних значений в мг и их среднеквадратических ошибок.

Время, сутки	Контроль	AgNO ₃ 0,05 мкМ	AgNO ₃ 0,1 мкМ	AgNO ₃ 1 мкМ
0	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,063
1	1,975 ± 0,099	1,863 ± 0,093	1,788 ± 0,089	1,725 ± 0,086
2	2,538 ± 0,127	2,225 ± 0,111	2,013 ± 0,101	1,750 ± 0,088
3	3,050 ± 0,153	2,763 ± 0,138	2,513 ± 0,126	1,800 ± 0,090
4	3,600 ± 0,180	3,663 ± 0,183	2,663 ± 0,133	1,850 ± 0,093
5	4,150 ± 0,208	4,213 ± 0,211	3,175 ± 0,159	2,405 ± 0,120
6	5,100 ± 0,255	4,450 ± 0,223	3,270 ± 0,164	2,700 ± 0,135
7	5,800 ± 0,290	4,750 ± 0,238	3,638 ± 0,182	3,005 ± 0,150
8	5,838 ± 0,292	4,850 ± 0,243	3,738 ± 0,187	2,750 ± 0,138

При этом при действии серебра эффект снижения сухой массы более выражен чем при действии меди и коррелирует с данными по снижению роста культуры при действии ионов серебра. Значительное снижение роста сухой массы при действии серебра в концентрации 1 мкМ проявляется уже на 3-е сутки (таблица 2) также, как и снижение роста культуры при действии серебра в этой концентрации (рис.1Б).

Мы исследовали влияние меди и серебра на суспензию клеток *Scenedesmus quadricauda*, регистрируя параметр F_v/F_m , показывающий эффективность фотосинтетического аппарата микроводорослей и, в частности, ФСII — относительную переменную флуоресценцию или фотохимический квантовый выход, который получил значительное распространение при исследованиях токсичности различных агентов на фотосинтезирующие акватические организмы (Маторин, Рубин, 2012).

Таблица 3. Влияние ионов меди и времени инкубации на относительную переменную флуоресценцию (F_v/F_m) суспензии *Scenedesmus quadricauda*.

День	Контроль	CuSO ₄ 0,1 мкМ	CuSO ₄ 1 мкМ	CuSO ₄ 10 мкМ
1	0,516 ± 0,026	0,512 ± 0,026	0,515 ± 0,026	0,512 ± 0,026
2	0,639 ± 0,032	0,649 ± 0,033	0,626 ± 0,031	0,576 ± 0,029
3	0,635 ± 0,032	0,617 ± 0,031	0,592 ± 0,030	0,542 ± 0,027
4	0,656 ± 0,033	0,531 ± 0,027	0,514 ± 0,026	0,502 ± 0,025
5	0,595 ± 0,030	0,490 ± 0,025	0,484 ± 0,024	0,434 ± 0,022
6	0,612 ± 0,031	0,460 ± 0,023	0,453 ± 0,023	0,413 ± 0,021
7	0,618 ± 0,031	0,472 ± 0,024	0,462 ± 0,023	0,418 ± 0,020
8	0,660 ± 0,033	0,540 ± 0,028	0,549 ± 0,029	0,468 ± 0,023

Таблица 4. Влияние ионов серебра и времени инкубации на относительную переменную флуоресценцию (F_v/F_m) суспензии *Scenedesmus quadricauda*.

День	Контроль	AgNO ₃ 0,05 мкМ	AgNO ₃ 0,5 мкМ	AgNO ₃ 1 мкМ
1	0,516 ± 0,026	0,513 ± 0,026	0,496 ± 0,025	0,498 ± 0,025
2	0,639 ± 0,032	0,636 ± 0,032	0,609 ± 0,030	0,605 ± 0,030
3	0,635 ± 0,032	0,628 ± 0,031	0,610 ± 0,031	0,605 ± 0,030
4	0,656 ± 0,033	0,537 ± 0,027	0,515 ± 0,026	0,508 ± 0,025
5	0,595 ± 0,030	0,435 ± 0,022	0,397 ± 0,020	0,385 ± 0,019
6	0,612 ± 0,031	0,450 ± 0,023	0,404 ± 0,020	0,401 ± 0,020
7	0,618 ± 0,031	0,526 ± 0,026	0,416 ± 0,021	0,412 ± 0,021
8	0,660 ± 0,033	0,599 ± 0,030	0,441 ± 0,022	0,452 ± 0,023

Из представленных в таблицах данных видно, что и медь, и серебро вызывает дозозависимое снижение параметра F_v/F_m с течением времени, таблица 3 и 4 соответственно. При действии обоих токсикантов значительное снижение исследуемого параметра начинает проявляться на 4-е сутки инкубации культуры клеток, что коррелирует с предыдущими данными по кинетике роста культуры и ее сухой массы в образцах. Изначально пониженный параметр F_v/F_m , соответствующий примерному значению – 0,51 по-видимому можно объяснить начальным стрессом при переносе клеток из маточной культуры в новую среду для образцов. Далее на 2-е и 3-е сутки параметр возрастает во всех образцах, показывая адаптацию клеток даже на фоне действия токсикантов. При этом начиная с 4-х суток происходит снижение, исследуемого параметра даже при низких и средних концентрациях металлов, таким образом показывая большую чувствительность фотосинтетического аппарата к действию металлов по сравнению с критериями роста культуры клеток и их сухой массы при этом воздействии. Наибольшее отличие F_v/F_m от контроля (почти в полтора раза) наблюдается при действии серебра в концентрации – 1 мкМ на 5-е сутки инкубации, а меди в концентрации 10 мкМ на 6-сутки. При этом на 8-е сутки наблюдается частичное повышение F_v/F_m , особенно при малых концентрациях токсикантов, что может говорить об адаптационном процессе в выживаемых и вновь образованных клетках. Наибольший такой эффект адаптации наблюдался при действии серебра в наименьшей концентрации - 0,05 мкМ (различие с контролем – 10%).

Таким образом использование, уже зарекомендовавших себя, «классических» наборов медов исследования токсичности поллютантов нам удалось обнаружить, что медь и серебро в

микромолярных концентрациях обладает дозозависимой токсичностью, которая значительно начинает проявляться, начиная с 4-х и 3-х суток инкубации клеток с токсикантами соответственно. При этом фотосинтетический аппарат микроводорослей оказывается более чувствительным к воздействию металлов.

Для выявления скрытых токсических воздействий токсикантов и их механизмов в более ранние сроки мы провели дальнейшие исследования с использованием различных спектральных подходов и методик.

Влияние меди и серебра на пигментный состав в суспензии клеток *Scenedesmus quadricauda*.

При использовании абсорбционной спектроскопии проведены исследования влияния ионов меди и серебра на содержание хлорофилла в клетках *Scenedesmus* при инкубации на свету и в темноте.

Из рис.2 видно, что при низких концентрациях обоих металлов существенных изменений в содержании хлорофилла не наблюдается. Однако при высоких концентрациях происходит уменьшение оптической плотности при 678 нм по сравнению с контролем. Данный эффект более выражен при инкубации на свету, особенно для серебра (рис.2 В), что свидетельствует о выцветании хлорофилла под действием фотоокисления.

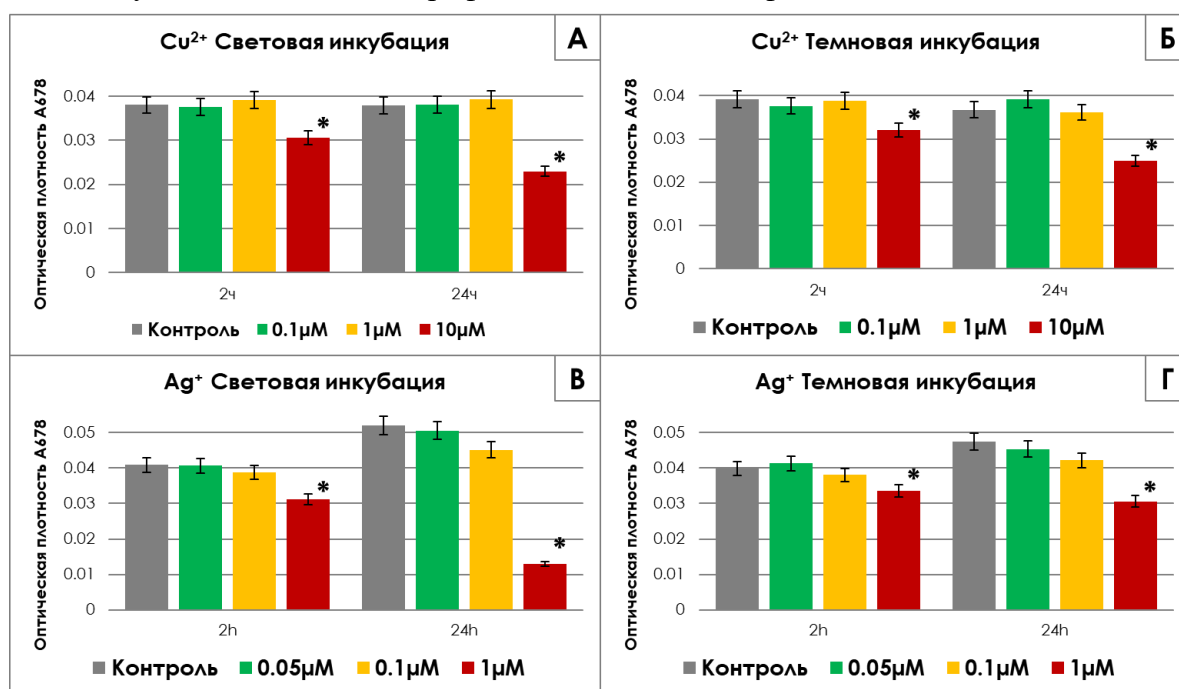


Рис.2. Изменение оптической плотности в полосе поглощения хлорофилла «а» ($\lambda_{\text{max}}=678$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью (А, Б) и серебром (В, Г). Инкубация клеток до измерения проводилась 2 и 24 ч при освещении светом интенсивностью 50 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ (А, В) и в темноте (Б, Г). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Также по измерению оптической плотности при 480нм были получены данные по влиянию меди и серебра на содержание каротиноидов в клетках микроводорослей (рис.3).

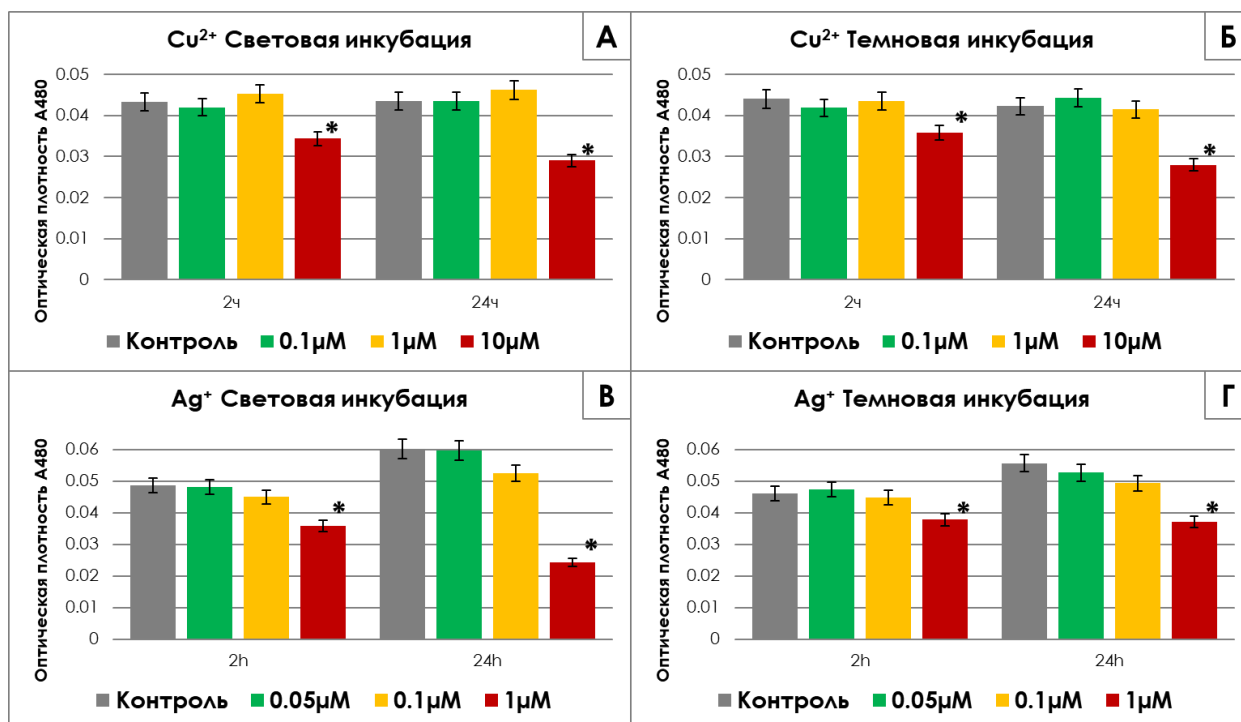


Рис.3. Изменение оптической плотности в полосе поглощения каротиноидов ($\lambda_{\text{max}}=678$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью (А, Б) и серебром (В, Г). Инкубация клеток до измерения проводилась 2 и 24 ч при освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А, В) и в темноте (Б, Г). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Как и в случае с хлорофиллом, низкие концентрации металлов не вызывают существенных изменений и в содержании каротиноидов. При более высоких концентрациях содержание каротиноидов снижается, но это снижение менее выражено, чем у хлорофилла.

Менее выраженное снижение каротиноидов говорит о большей устойчивости их к окислительному стрессу, вызванному тяжелыми металлами. Относительная стабильность каротиноидов может быть частью адаптивной реакции клеток на стресс.

Влияние ионов меди и серебра на интенсивность флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток при их инкубации в световых и темновых условиях.

На рис.4 представлены данные по влиянию тяжелых металлов на F_v/F_m - важнейший показатель эффективности ФСII. При действии меди значение этого параметра не изменялось (рис.4 А, Б), а при действии серебра эффект наблюдался только при высокой концентрации и был более выражен в темновых условиях (рис.4 В, Г). Снижение F_v/F_m указывает на нарушение функционирования ФСII, возможно, из-за повреждения белков реакционного центра или нарушения переноса электронов.

Более высокое значение F_v/F_m при инкубации на свету с ионами серебра (1 мкМ), вероятнее всего, связано с включением репарационных (адаптационных) процессов при световых условиях. Фотосинтез протекающий на свету является необходимым условием этих процессов (рис.4 В 24 часа).

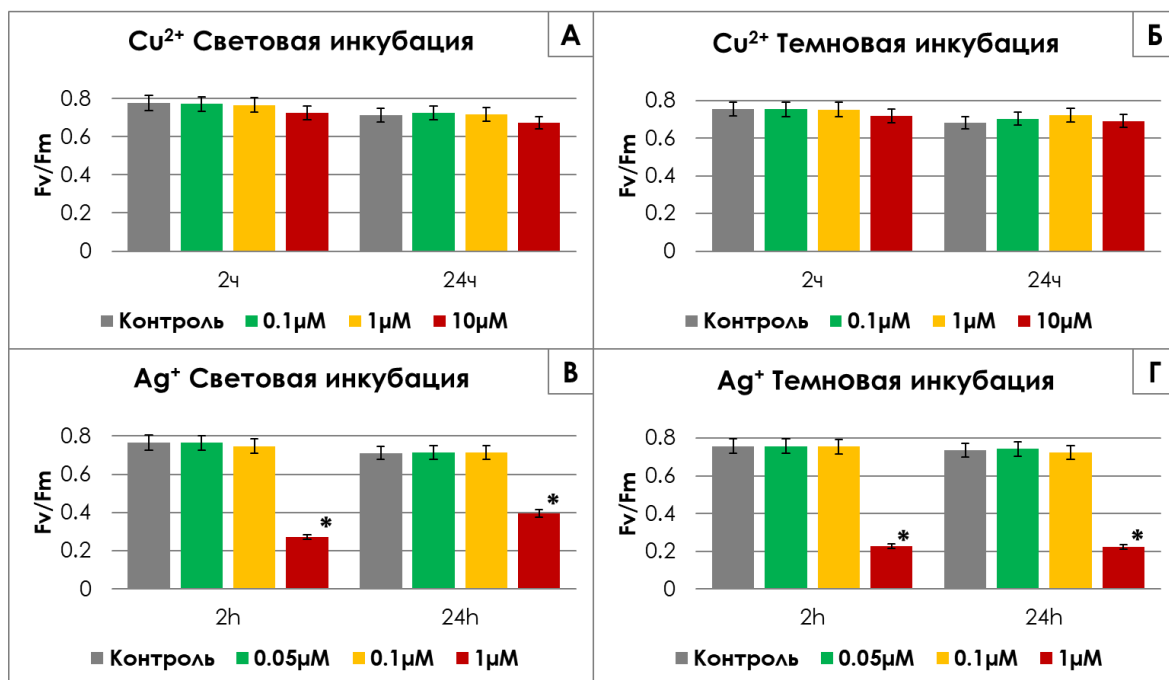


Рис. 4. Изменение F_v/F_m культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью (А, Б) и серебром (В, Г) в течение 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А, В) и в темновых условиях (Б, Г). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Формально, наблюдаемое уменьшение F_v/F_m может быть следствием роста F_0 при появлении закрытых РЦ или следствием уменьшения F_m при активации защитных механизмов тушения возбужденных состояний. И для уточнения предполагаемых нами механизмов мы посмотрели, как изменяются отдельно F_0 и F_m .

На рис.5 представлены значения минимальной (F_0) и максимальной (F_m) флуоресценции. Чтобы исключить зависимость F_0 и F_m от концентрации пигментов исходные значения F_0 и F_m делили на оптическую плотность суспензии на длине волны 450 нм (длина волны возбуждения флуоресценции).

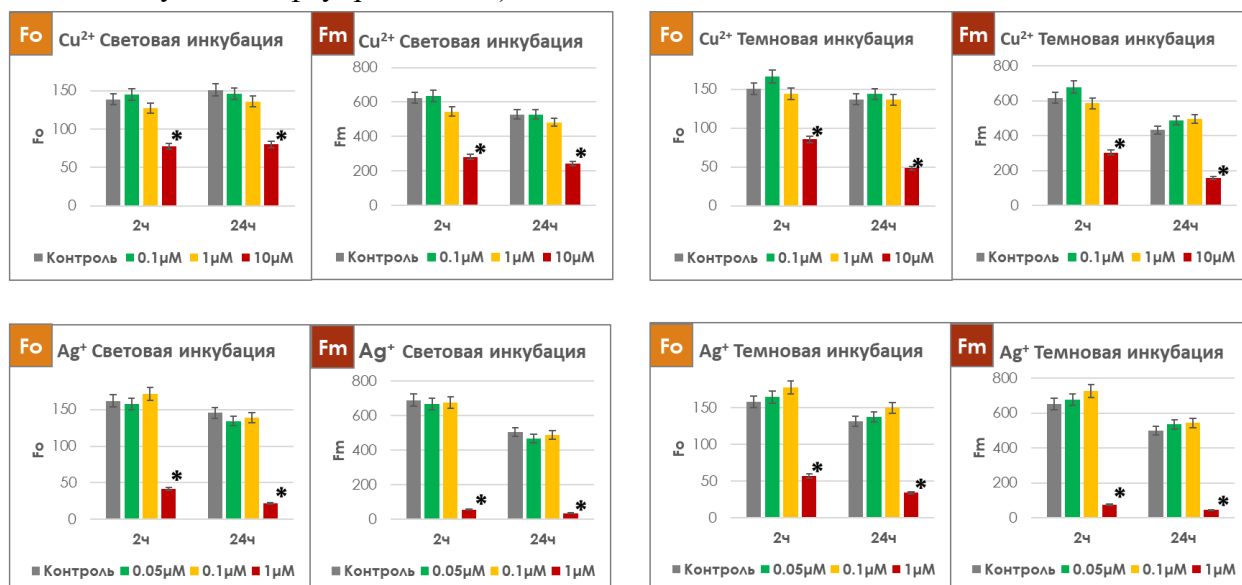


Рис. 5. Изменение удельных значений минимальной — F_0 (а, в) и максимальной — F_m флуоресценции (б, г) (в расчете на единицу поглощенной световой энергии) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с токсикантами в течение 2 и 24 ч при непрерывном

освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (а, б) и в темновых условиях (в, г). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

По полученным удельным значениям F_o и F_m можно судить о процессах фотохимического и нефотохимического тушения возбужденных молекул хлорофилла независимо от того сколько пигментов остается в пробе после действия токсикантов. При высоких концентрациях обоих металлов наблюдается значительное снижение как F_o , так и F_m . Для меди эффект более выражен при инкубации в темноте. Снижение параметров флуоресценции указывает тушение возбужденных молекул хлорофилла и может быть связано с активацией защитных механизмов, направленных на рассеивание избыточной энергии для предотвращения образования активных форм кислорода.

Влияние ионов меди и серебра на интенсивность флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках в условиях световой и темновой инкубации.

В дополнение к измерению флуоресценции в клеточных суспензиях, мы провели измерения флуоресценции отдельных клеток. На этих диаграммах каждой точке соответствует одна клетка (рис.6).

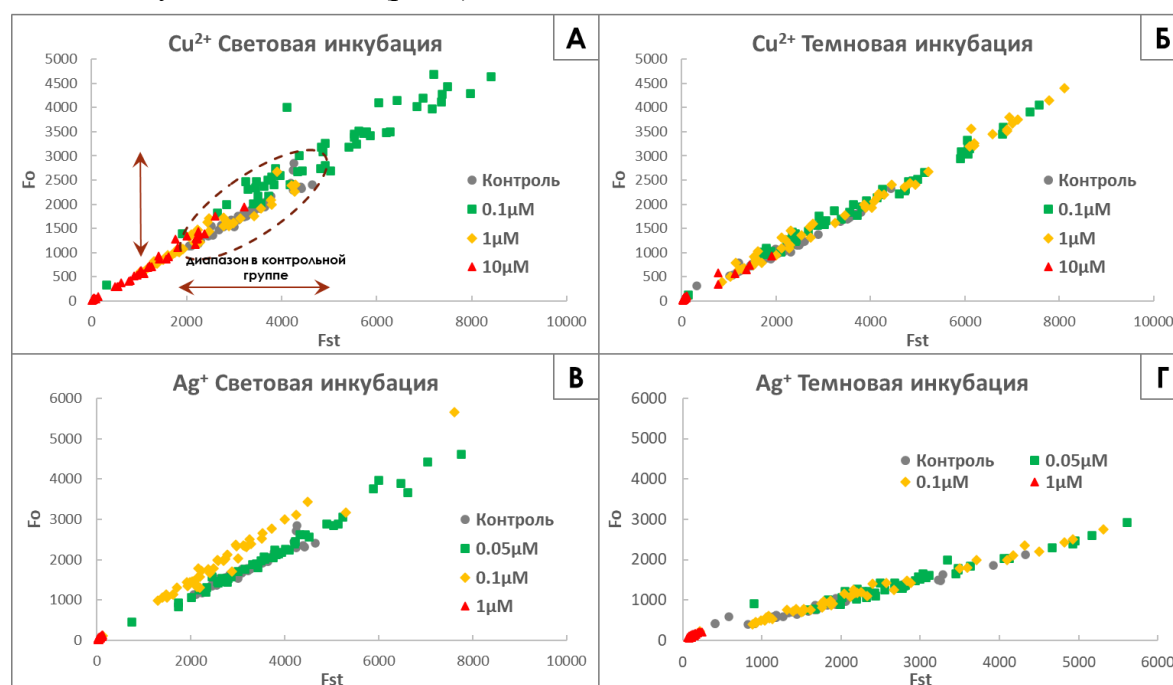


Рис. 6. Соотношения между интенсивностью максимальной (F_{st}) и интенсивностью минимальной (F_o) флуоресценции клетки в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии ионов меди (А, Б) и серебра (В, Г). Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А, В) и в темновых условиях (Б, Г).

Как видно, клетки в популяции значительно отличаются друг от друга по размеру и по содержанию хлорофилла поэтому интенсивность минимальной (F_o) и максимальной (F_{st}) флуоресценции меняется в 4-5 раз даже для контрольной группы (рис.6 А), показанной светло-серыми, круглыми маркерами.

Изменения в параметрах флуоресценции в ответ на действие металлов в данных координатах видны недостаточно хорошо, поэтому для большей наглядности результаты измерений на клетках были представлены в виде гистограмм (рис.7).

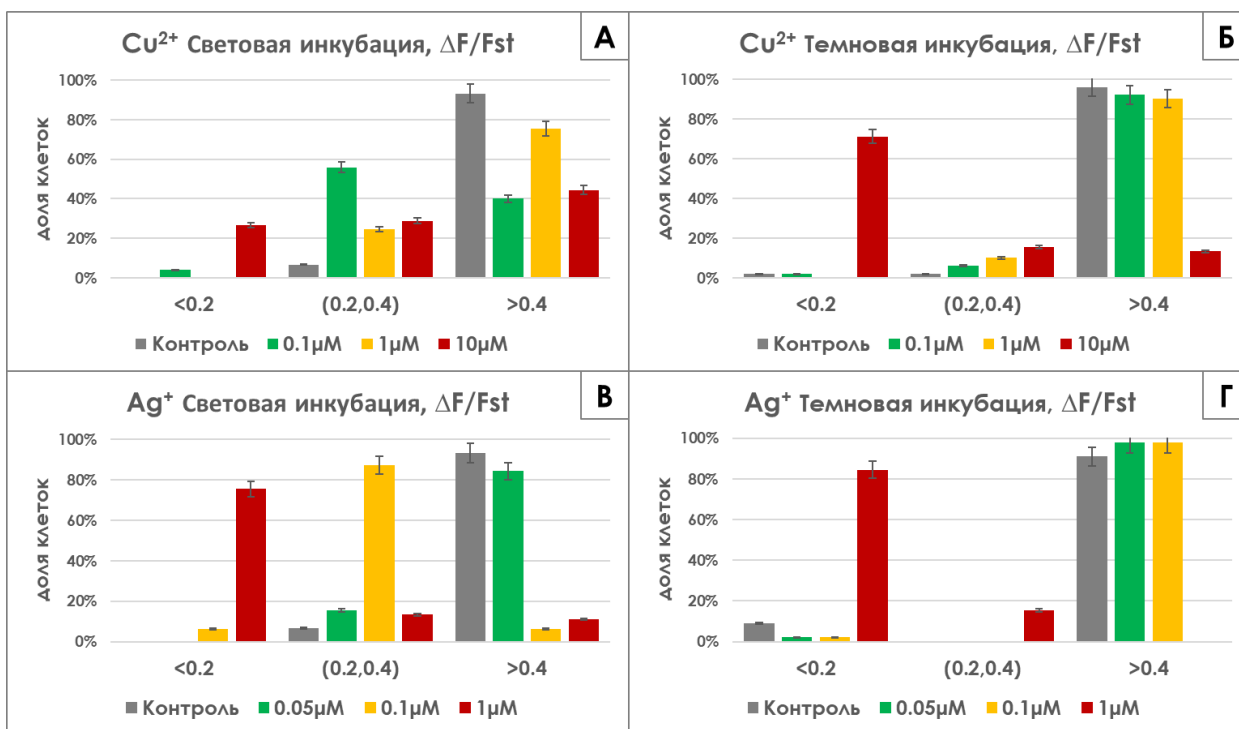


Рис. 7. Гистограммы распределения одиночных клеток по фотохимической активности ФСII. По оси абсцисс — относительная переменная флуоресценция ($\Delta F/F_{st}$); по оси ординат — доля клеток в %. Инкубация клеток в контроле и с ионами меди (А, Б) и серебра (В, Г) до начала измерения проводилась в течение 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А, В) и в условиях темновой инкубации (Б, Г).

Весь диапазон измеренных значений $\Delta F/F_{st}$ на три области: область низких (0 – 0.2), средних (0.2-0.4) и высоких (>0.4) значений. На рис.7 показано, какая доля клеток в популяции попадает в области низкой, средней, и высокой активности ФСII. В контрольных условиях в популяции более 90% клеток соответствует категории высокой активности ФСII. С увеличением концентрации токсикантов распределение клеток смещается в сторону «средней» и «низкой» категории. В случае действия меди более выраженный эффект наблюдается при темновой инкубации (рис.7 Б), а при действии серебра - при световой инкубации (рис.7 В). Даже при гибели значительной части клеток, в популяции тем не менее остаются клетки с высоким значение $\Delta F/F_{st}$. Такая неоднородность реакции может иметь важное экологическое значение, обеспечивая выживание части популяции в стрессовых условиях за счет таких устойчивых к токсикантам клеток.

Далее мы рассчитали средние значения фотохимического квантового выхода ФСII ($\Delta F/F_{st}$) для популяции клеток под воздействием различных концентраций меди и серебра.

При высоких концентрациях наблюдается значительное снижение этого параметра, особенно в случае серебра (рис.8). Эффект более выражен при темновой инкубации. При низких и средних концентрациях серебра снижение $\Delta F/F_{st}$ более существенно в условиях световой инкубации. Отдельно отметим, что эффекты малых и средних концентраций токсикантов вообще не были обнаружены при измерениях флуоресценции в суспензии. Таким образом определение показателей флуоресценции одиночных клеток является более чувствительным методом при выявлении токсического действия тяжелых металлов, чем стандартные измерения в кювете.

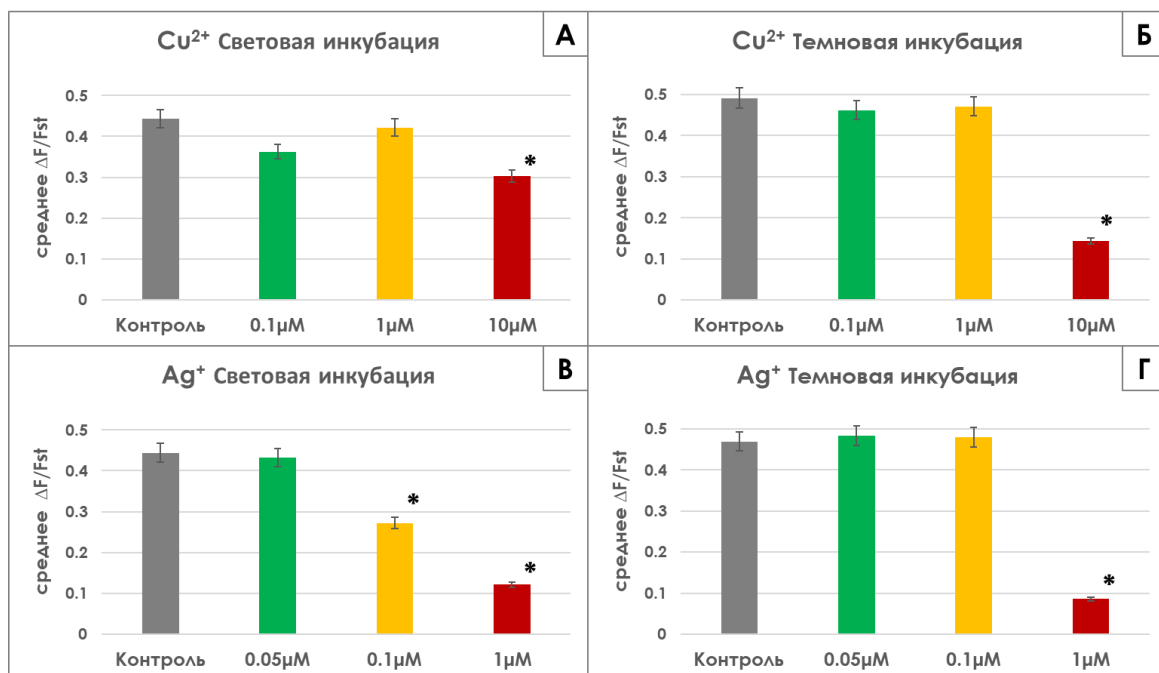


Рис. 8. Значения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди (А, Б) и серебра (В, Г). Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А, В) и в темноте (Б, Г). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Аналогично, как и для суспензий клеток (рис.5) для одиночных клеток мы рассчитали средние значения минимальной (F_0) и максимальной (F_{st}) флуоресценции.

Из рис.9 видно, что при низких концентрациях обоих металлов наблюдается увеличение как F_0 , так и F_{st} . Такое может происходить при нарушении деления клеток, при котором клетки увеличиваются в размерах, накапливают хлорофилл, но не могут поделиться.

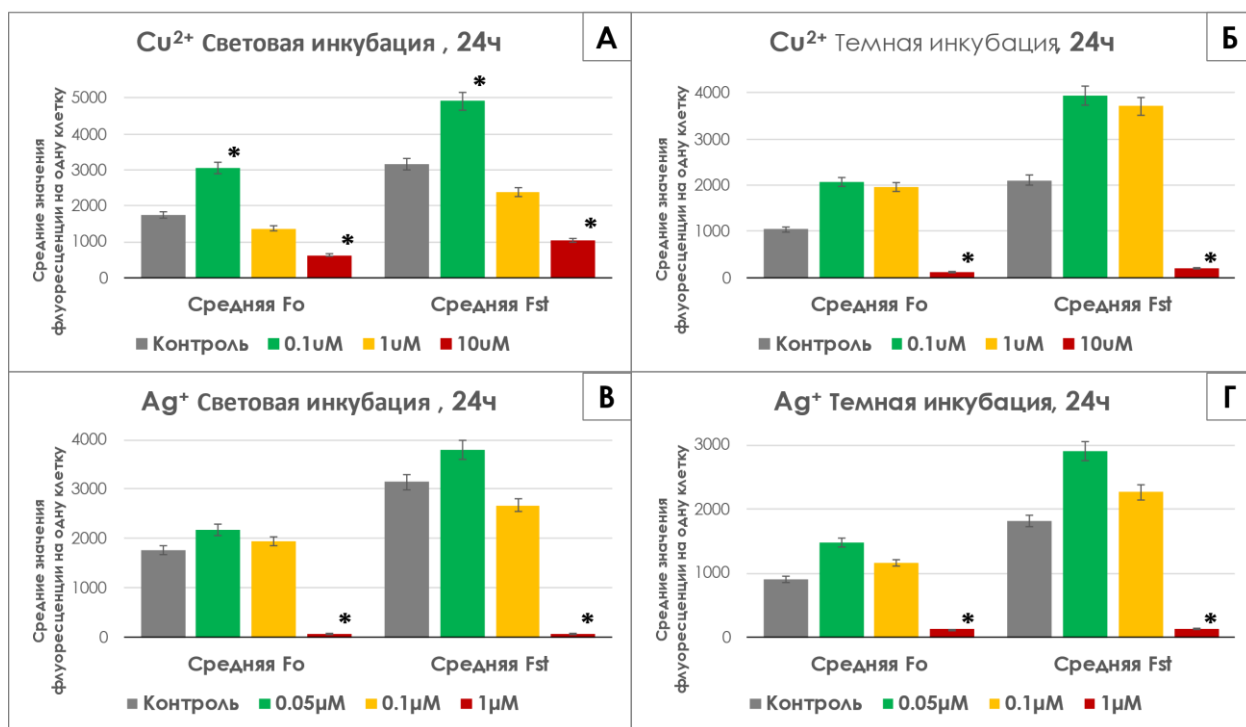


Рис. 9. Средние значения минимальной (F_0) и максимальной (F_{st}) флуоресценции на одну клетку культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди (А, Б) и серебра (В, Г). Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении

светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А, В) и в темновых условиях (Б, Г). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

При высоких концентрациях, особенно в случае с серебром, мы наблюдаем резкое снижение F_0 и F_{st} (рис.9 В, Г). Примечательно, что для наибольшей концентрации меди эффект более выражен при темновой инкубации (рис.9 Б).

Снижение флуоресценции может быть связано не только с тушением возбужденных состояний хлорофилла, но и с общим снижением содержания пигмента в клетках.

Особенности действия меди и серебра на индукцию быстрой флуоресценции культуры микроводоросли *S. quadricauda*. ОЛР-кривые.

Мы изучили влияние ионов меди и серебра на ОЛР-кривые флуоресценции хлорофилла, которые отражают различные стадии фотосинтетического транспорта электронов. Из рис. 10 видно, что при высоких концентрациях обоих металлов происходит значительное изменение формы кривых, снижение уровней J, I и P, что свидетельствует о нарушениях в цепи переноса электронов ФСII. Под действием серебра в концентрации 1 мкМ, наблюдается практически полное подавление характерных пиков кривой ОЛР (рис.10 В, Г).

Для меди эффект более выражен при темновой инкубации, в то время как для серебра влияние освещения менее заметно. Эти данные свидетельствуют о нарушении функционирования фотосинтетического аппарата при высоких концентрациях токсикантов и предполагают различные механизмы их действия в зависимости от условий освещения.

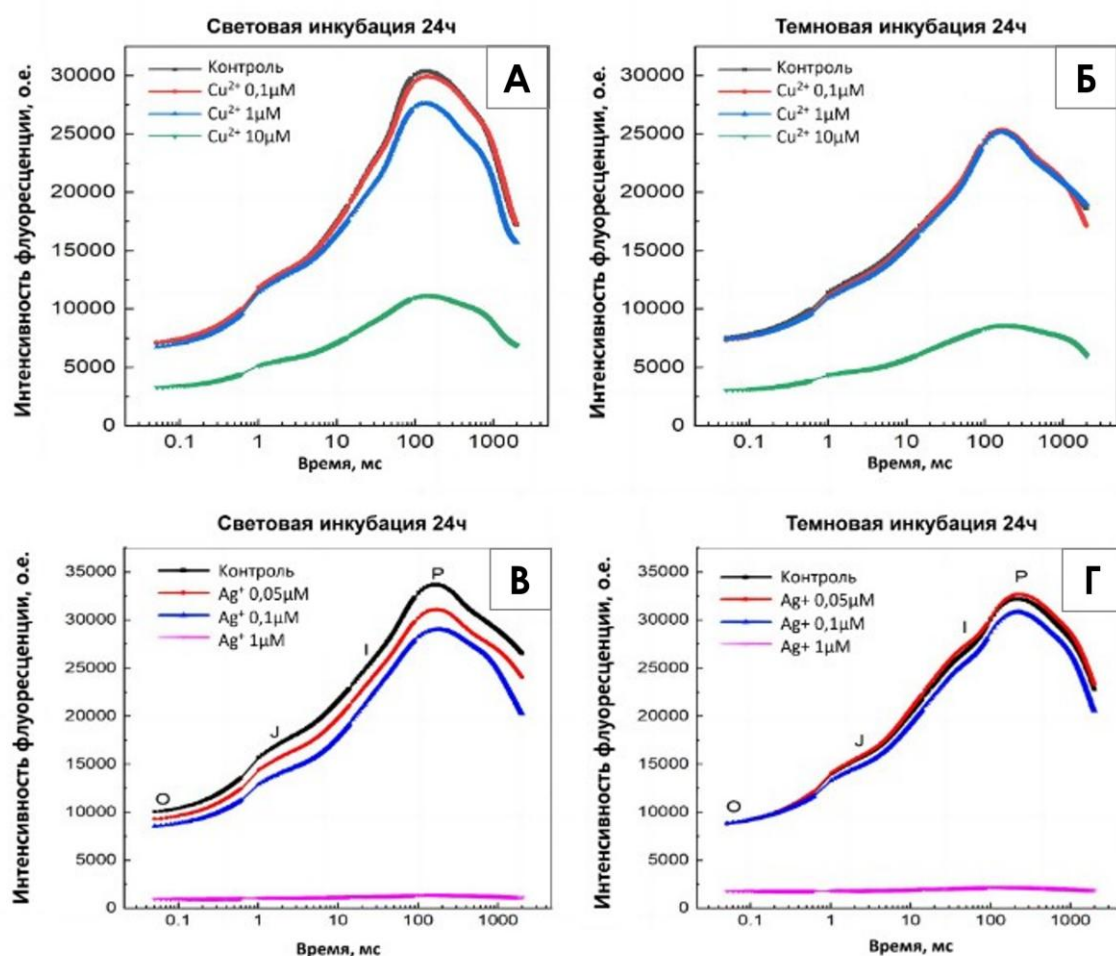


Рис. 10. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* (ОЛР-кривые) микроводоросли *S. quadricauda* после 24 ч инкубации с CuSO_4 в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ (А, Б) и AgNO_3 в

концентрациях 0,05, 0,1 и 1 мкМ (В, Г) в световых условиях при $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (А, В) и в темновых условиях (Б, Г).

ОЛПР-кривые флуоресценции в образцах с токсикантами и в контроле было сложно сопоставить друг с другом по скорости переноса электронов, т.к. содержание хлорофилла и амплитуда сигналов сильно отличались.

Для того, чтобы исключить влияние выцветания хлорофилла на фазы индукционных кривых, проведено их нормирование на начальный и максимальный уровень флуоресценции (рис. 11 А, Б, В, Г). После нормирования, из каждой кривой при действии токсиканта мы отнимали контрольную кривую, что позволило выявить некоторые эффекты воздействия металлов на электрон транспортные процессы. При воздействии меди мы наблюдали значительное увеличение амплитуды в фазах J и I, что может говорить о накоплении восстановленных хинонов при ингибировании их окисления в цитохромном комплексе (рис. 11 Д, Е).

При этом в темновых условиях эффект был более выражен, чем на свету. При действии серебра мы наблюдали уменьшение амплитуд фаз J и I, вероятной причиной которого является ингибирование ЭТЦ на донорной стороне ФСII (рис. 11 Ж, З).

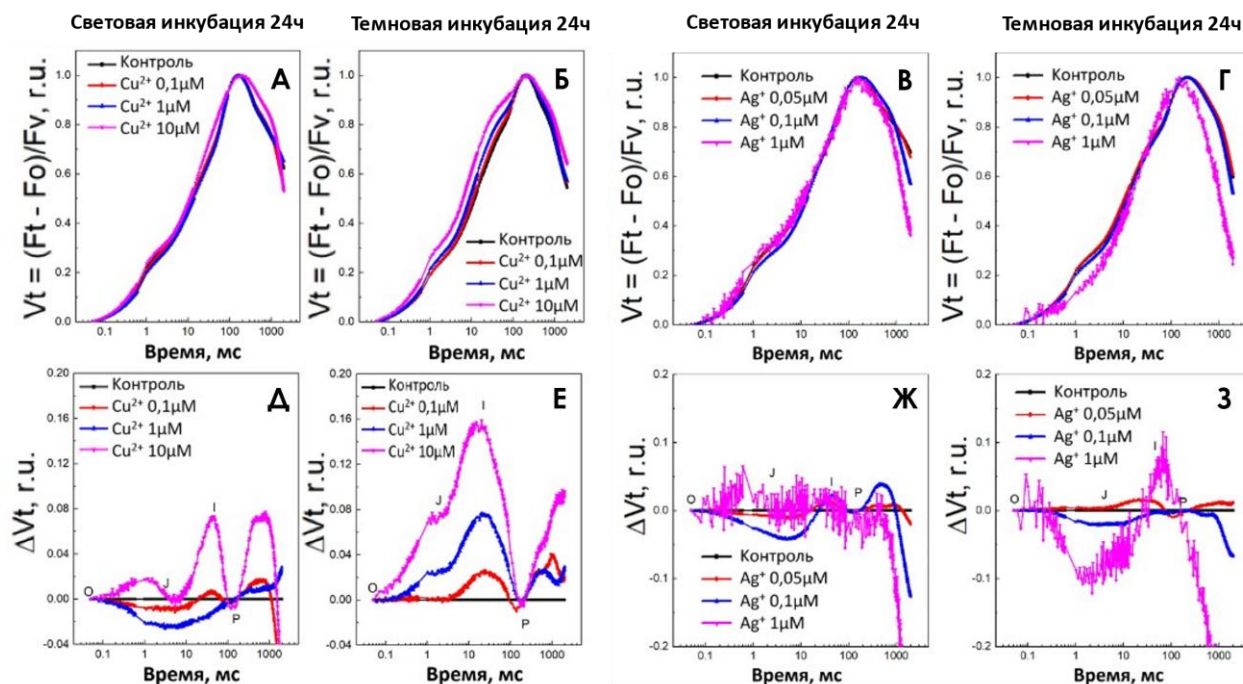


Рис. 11. Нормированные индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* (ОЛПР-кривые) микроводоросли *S. quadricauda* после 24 ч инкубации с CuSO_4 в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ (А, Б, Д, Е) и AgNO_3 в концентрациях 0,05, 0,1 и 1 мкМ (В, Г, Ж, З) в световых условиях при $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (А, В, Д, Ж) и в темновых условиях (Б, Г, Е, З). ОЛПР-кривые нормированы на максимальную переменную флуоресценцию $V_t = (F_t - F_o)/F_v$ (А, Б, В, Г) и представлены в виде разности значений функций $\Delta V_t = (V_t(\text{токсикант}) - V_t(\text{контроль}))$ (Д, Е, Ж, З).

Действие меди и серебра на параметры кривых затухания флуоресценции культуры микроводоросли *S. quadricauda*.

Мы исследовали параметры кривых затухания флуоресценции в суспензиях клеток под действием меди и серебра в максимальных, исследуемых концентрациях 10 и 1 мкМ соответственно, при световой и темновой инкубации клеток. Эти данные дают информацию о кинетике перехода возбужденных состояний хлорофилла в основное состояние. Мы

наблюдаем значительные изменения этих параметров при высоких концентрациях обоих металлов и различия в эффектах при действии меди (Таблица 5) и серебра (Таблица 6).

Для меди основные изменения наблюдаются в амплитудах компонент распада, в то время как время жизни меняется незначительно. Это может свидетельствовать о возникновении тушения возбужденных состояний по статическому механизму, при котором время затухания меняется незначительно.

Таблица 5. Значения параметров кривой затухания флуоресценции в суспензиях *S. quadricauda* в условиях темновой и световой инкубации в контроле и при обработке медью в концентрации 10 мкМ.

Образец	τ_1 , нс	τ_2 , нс	A_1 , отн. ед.	A_2 , отн. ед.	$A_1 \tau_1$	$A_2 \tau_2$	Доля медленного компонента
Контроль в темноте	0,447	1,165	87,0	108,7	39	127	0,77
Контроль на свету	0,426	1,03	84,0	138,8	36	143	0,80
Cu^{2+} 10μМ в темноте	0,452	1,201	45,9	86,9	21	104	0,83
Cu^{2+} 10μМ на свету	0,372	1,07	51,2	98,0	19	105	0,85

Таблица 6. Значения параметров кривой затухания флуоресценции в суспензии *S. quadricauda* в условиях темновой и световой инкубации в контроле и при обработке серебром в концентрации 1 мкМ.

Образец	τ_1 , нс	τ_2 , нс	A_1 , отн. ед.	A_2 , отн. ед.	$A_1 \tau_1$	$A_2 \tau_2$	Доля медленного компонента
Контроль в темноте	0,447	1,165	87,0	108,7	39	127	0,77
Контроль на свету	0,426	1,030	84,0	138,8	36	143	0,80
Ag^+ 1μМ в темноте	0,179	1,208	106,5	31,9	19	39	0,67
Ag^+ 1μМ на свету	0,096	0,826	58,4	40,5	6	33	0,86

Амплитуды A_1 и A_2 были нормированы на оптическую плотность образца, поэтому их изменение не связано с изменением содержания пигментов в образцах.

Возможно ионы меди оказывают непосредственное тушение светособирающих комплексов, а возможно они действуют опосредованно, вмешиваясь в природные механизмы нефотохимического тушения. К статическому тушению флуоресценции может приводить переход тилакоидной мембраны из состояния 1 в состояние 2. В норме такой переход срабатывает при сильном восстановлении пула хинонов. Косвенным признаком восстановления хинонов, по крайней мере в случае меди, можно считать более быстрый подъем флуоресценции на I-P фазе ОЖР-кривой (рис.11 Д, Е). В общем случае процент восстановления пула хинонов зависит от соотношения скорости восстановления и скорости окисления. Т.к. активность ФСII в целом уменьшается (данные по $\Delta F/F_{st}$ рис.8), увеличение скорости восстановления пула хинонов представляется нам маловероятным. Поэтому мы предполагаем, что в случае действия тяжелых металлов увеличение степени восстановления пула хинонов возникает в результате ингибирования процесса его окисления.

По сравнению с медью серебро приводило к еще более существенному (более 3-х раз) уменьшению амплитуды быстрой и медленной компонент кинетики затухания флуоресценции. Отличие от меди состояло в том, что при этом также уменьшалась и длительность компонент. Поэтому в случае действия серебра возникает тушение по динамическому и статическому типу. Такое тушение возможно по разным причинам, например, со стороны каротиноидов ксантофиллового цикла или со стороны катиона P680^+ при нарушении работы кислород выделяющего комплекса или при неспецифическом повреждении белка D1 активными формами кислорода. По нормированным ОЖР-кривым (рис.

11 3) мы наблюдали «провал» в области 1 мс относительно контроля, что возникает при повреждении кислород выделяющего комплекса и накоплении $P680^+$.

Влияние меди и серебра на характер световых кривых относительной скорости линейного электронного транспорта (rETR) и NPQ.

Мы исследовали характер световых кривых относительного линейного электронного транспорта (rETR) при воздействии меди (10 мкМ) и серебра (0,1 мкМ) при условиях световой и темновой инкубации. Кривые отражают зависимость скорости электронного транспорта от интенсивности света. При действии меди наблюдалось значительное снижение rETR при интенсивностях света от 600 мкМ и выше. Это указывает на общее подавление активности электрон-транспортной цепи. Эти изменения могут быть связаны как с повреждением компонентов электрон-транспортной цепи, так и с активацией защитных механизмов, предотвращающих фотоокислительное повреждение при стрессе.

Существенных различий между световой и темновой инкубацией мы не наблюдали. Максимальная скорость электронного транспорта ограничена переносом электрона на самом медленном этапе. Обычно таким узким местом является стадия окисления пластохинона в цитохромном комплексе. Возможно одним из аспектов действия меди является нарушение электронного транспорта именно в этом месте, т.к. по нашим данным уменьшалась максимальная скорость (примерно в полтора раза). Для серебра изменения rETR не выявлялись.

Влияние меди и серебра на нефотохимическое тушение (NPQ).

NPQ являясь важным защитным механизмом, позволяет фотосинтезирующим организмам рассеивать избыточную световую энергию в виде тепла. При действии меди (10 мкМ) мы наблюдали увеличение NPQ по отношению к контролю, особенно при высоких интенсивностях света. Высокие значения NPQ обычно возникают на фоне замедленного электронного транспорта. Это может наблюдаться при уменьшении рН люмена в том случае, когда ингибирование электронного транспорта сопровождается более существенным ингибированием выхода протонов из внутритилакоидного пространства через АТФ-синтазу. В случае с медью увеличение NPQ было более выражено при световой инкубации, что может быть связано с активацией светозависимых защитных механизмов. Для серебра (0,1 мкМ) различия NPQ от контроля менее заметны.

Особенности действия меди и серебра на ОЛР-кривые быстрой флуоресценции культуры цианобактерий *Synechocystis sp. PCC 6803*.

В качестве сравнительного анализа с ОЛР-кривыми культуры *S. quadricauda* мы также исследовали влияния ионов меди и серебра на характер ОЛР-кривых в суспензиях культуры цианобактерий *Synechocystis PCC 6803*.

Предварительный анализ различных спектральных параметров и индукции кривых роста показал, что к концентрациям токсикантов исследованных ранее на микроводорослях цианобактерии оказались полностью резистентны, поэтому мы увеличили концентрации металлов. Из рис. 12 А видно, что медь вызывает дозозависимое увеличение параметров флуоресценции хлорофилла в образцах по сравнению с контролем. Что может говорить о нарушении переноса электрона по электрон транспортной цепи, но отсутствия выцветания хлорофилла, по крайней мере при действии меди в исследованных концентрациях.

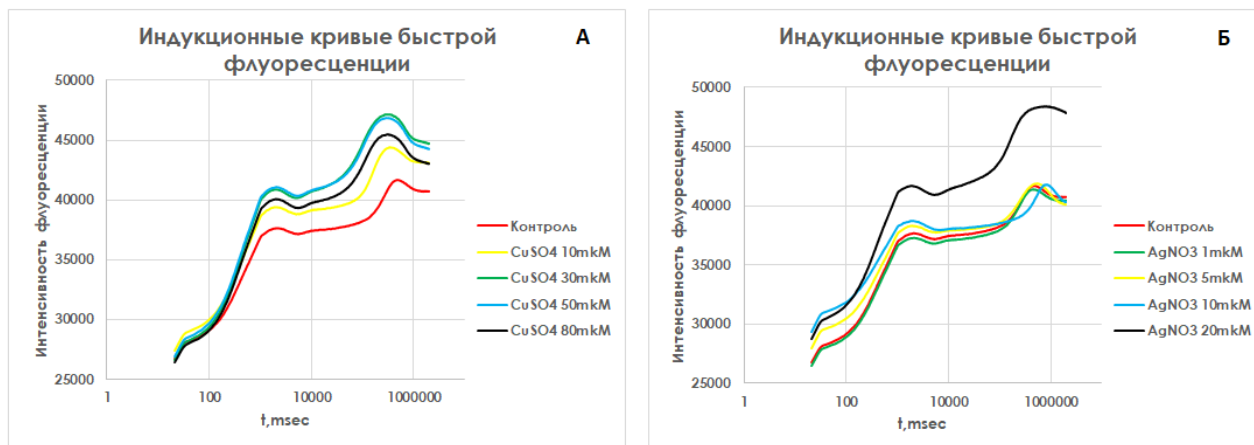


Рис. 12. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЖП) культуры *Synechocystis* sp. PCC6803, измеренные после 2 ч световой при $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ в присутствии соли меди (А) и серебра (Б).

При действии серебра (рис. 12 Б) подобный эффект наблюдался только при действии наибольшей исследованной концентрации. Таким образом даже при относительно высоких концентрациях тяжелых металлов цианобактерии проявляют большую устойчивость и адаптивность к исследуемым токсикантам по сравнению с таковым у микроводорослей.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ионы меди (Cu^{2+}) и серебра (Ag^+) в микромолярных концентрациях оказывают выраженное дозозависимое токсическое действие на микроводоросль *Scenedesmus quadricauda*. Нарушения проявлялись в снижении темпов роста, сухой массы клеток и фотохимической активности ФСII, что подтверждалось снижением параметров F_v/F_m , PI_{ABS} и $rETR$. Усиление NPQ указывало на активацию защитных механизмов рассеивания избыточной световой энергии, особенно при воздействии меди. Серебро вызывало более агрессивное фотоокислительное повреждение фотосинтетического аппарата, особенно при инкубации на свету.

Воздействие металлов приводило к деградации фотосинтетических пигментов, причём каротиноиды демонстрировали большую устойчивость по сравнению с хлорофиллом. Анализ кривых тушения флуоресценции показал преобладание статического механизма тушения при действии меди и сочетание статического и динамического механизмов при действии серебра.

Изучение флуоресценции на уровне одиночных клеток позволило выявить субпопуляции с различной чувствительностью к токсикантам, что подтверждает высокую степень клеточной гетерогенности в ответ на стрессорное воздействие и подчёркивает необходимость применения методов одиночной клеточной флуоресценции в экологическом мониторинге.

Цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 продемонстрировала значительно более высокую устойчивость к действию тяжёлых металлов по сравнению с *Scenedesmus quadricauda*, что указывает на существенные видовые различия в адаптационных стратегиях фотосинтезирующих организмов к металл-индуцированному стрессу.

Основные выводы

1. Исследование влияния ионов меди в концентрациях - 0,1-10 мкМ и серебра в концентрациях - 0,05-1 мкМ на размножение клеток *Scenedesmus quadricauda* показали, дозозависимое снижение роста клеток в популяции, которое начинает проявляться при концентрации меди 10 мкМ на 4-е сутки инкубации, а серебра в концентрации 1 мкМ на 3-е

сутки инкубации, примерно в полтора раза по сравнению с этим параметром в контроле. Снижение сухой массы водорослей при действии Cu^{2+} и Ag^+ коррелировало с замедлением роста клеток в те же сроки, что и уменьшение скорости роста культуры, достигая примерно полуторакратного снижения по сравнению с контролем.

2. Относительная переменная флуоресценция (F_v/F_m), при действии меди и серебра дозозависимо снижалась при всех концентрациях начиная с 4-х суток инкубации, что указывает на высокую чувствительность ФСА к их воздействию. Наибольшее снижение параметра наблюдалось при действии 1 мкМ Ag^+ на 5-е сутки и 10 мкМ Cu^{2+} на 6-е сутки (почти на 50%). К 8-м суткам особенно при низких концентрациях металлов (Ag^+ - 0,05 мкМ и Cu^{2+} - 0,1 мкМ) проявлялись признаки адаптации клеток, отражаемые в повышении параметра F_v/F_m .

3. Ионы меди и серебра в максимальных концентрациях 10 и 1 мкМ соответственно вызывают деградацию пигментов микроводорослей. Наибольшее снижение концентрации хлорофилла *a* по сравнению с контролем наблюдается при 24-х часовой инкубации в световых условиях с медью примерно на 65%, а при действии серебра при тех же условиях инкубации в 4 раза. Снижение уровня каротиноидов при действии токсикантов в максимальной концентрации менее выражено и составляет примерно 50% при 24-х часовой инкубации в темновых условиях с медью, а в случае с серебром максимальный эффект снижения наблюдается при 24-х часовой инкубации в световых условиях – почти в 2,5 раза.

4. Изменения параметров флуоресценции ОЛР-кривых микроводорослей при действии ионов Cu^{2+} и Ag^+ в максимальных концентрациях 10 и 1 мкМ соответственно показали значительное ингибирование электронного транспорта в ЭТЦ, что проявляется снижением флуоресценции в фазах J, I и P. Наибольший ингибирующий эффект наблюдается при действии серебра (1 мкМ), наблюдается практически полное подавление характерных пиков кривой ОЛР. При действии меди (10 мкМ) наибольшее снижение пиков ОЛР кривой наблюдается при темновых условиях инкубации (24 часа), интенсивность флуоресценции в максимуме снижается почти в 3,5 раза (точка – P).

5. Воздействие меди (10 мкМ) и серебра (0,1 мкМ) вызывало увеличение NPQ, наиболее выраженное при действии меди в условиях световой инкубации. Так при максимальной плотности фотосинтетического светового потока - 1400 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ NPQ при действии меди было 5,5 раза выше контроля. Так как активация защитного механизма NPQ срабатывает в ответ на уменьшение pH внутритилакоидного пространства, мы считаем, что действие меди приводит к накоплению протонов в люмене. Поскольку процесс поступления протонов внутрь тилакоида при ингибировании ФСII замедляется, полученные данные говорят о накоплении протонов в результате замедления их выхода в строму через хлоропластную АТФ синтазу.

6. Микрофлуориметрический анализ отдельных клеток выявил неоднородность реакций популяций на Cu^{2+} и Ag^+ по интенсивности минимальной (F_0) и максимальной (F_{st}) флуоресценции. По параметру эффективности фотосинтетического аппарата одиночных клеток микроводорослей - $\Delta F/F_{st}$ выявлено три подпопуляции. При действии ионов меди (10 мкМ) и серебра (1 мкМ) в наибольших концентрациях в течении 24 часов подпопуляции с низким значением параметра (0 – 0,2) составляют 70 и 80% клеток в популяции соответственно, эффект более выражен при темновых условиях инкубации. При высоких

концентрациях, меди и серебра наблюдается значительное снижение усредненных параметров F_0 и F_{st} на одну клетку. При действии меди (10 мкМ) эффект более выражен при темновой инкубации, а для серебра (1 мкМ) при световой инкубации. Для концентраций меди (0,1 и 1 мкМ) и серебра (0,05 и 0,1 мкМ) наблюдается увеличение параметров F_0 и F_{st} .

7. Ионы меди и серебра в концентрациях 10 и 1 мкМ соответственно вызывают тушение возбужденных состояний хлорфилла *a*. В случае с медью – по статическому механизму, уменьшаются только амплитуды компонент распада, A_1 на 65% по сравнению с контролем и A_2 на 42%, в то время как время жизни меняется незначительно. В случае с серебром по статическому и динамическому механизму, время затухания τ_1 уменьшается почти в 4,5 раза по сравнению с контролем, а τ_2 на 25%, при этом амплитуда A_1 уменьшается на 45%, а A_2 почти в 3,5 раза.

8. Исследования показали, что *Synechocystis PCC 6803* более устойчива к ионам Cu^{2+} и Ag^+ по сравнению с *Scenedesmus quadricauda*. ОЖП тест выявил, что у микроводорослей фотохимическая активность значительно снижается уже при концентрациях меди – 10 мкМ, а серебра – 1 мкМ, тогда как цианобактерии при этих концентрациях демонстрируют адаптивные механизмы защиты, сохраняя фотосинтетическую активность на уровне контроля, значительные нарушения начинают проявляться при концентрациях меди от 50 мкМ а при действии серебра при 20 мкМ, при этом не происходит значительного выцветания пигментов.

Основные публикации Цзя Шуньчао по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика и 1.5.15. Экология (биологические науки) (в скобках приведены импакт-фактор журнала; объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах).

1. Pirutin S.K., Jia S., Yusipovich A.I., Shank M.A., Parshina E.Y., Rubin A.B. Vibrational spectroscopy as a tool for bioanalytical and biomonitoring studies // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol.24, No.8. – P.6947. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24086947>. (JIF 4,9; 4,04/0,81).

2. Pirutin S., Chaikovskii D., Shank M., Chivarzin M., Jia S., Yusipovich A., Suvorov O., Zhao Y., Bezryadnov D., Rubin A. Investigation of cell damage induced by silver nanoparticles in a model cell system // Pharmaceutics. – 2025. – Vol.17, No.4. – P. 398. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17040398>. (JIF 4.9; 3,35/0,37 п.л.).

3. Пирутин С.К., Шанк М.А., Цзя Ш., Конюхов И.В., Тодоренко Д.А., Червицов Р.Н., Фурсова П.В., Кабашникова Л.Ф., Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Комплексный анализ воздействия ионов меди на первичные процессы фотосинтеза *Scenedesmus quadricauda* по результатам измерений флуоресценции хлорофилла *a* в суспензии и на одиночных клетках // Компьютерные исследования и моделирование. – 2025. – Т. 17, №2. – С.293-322. (SJR 0,22; 3,35/0,33 п.л.).

Дополнительные публикации Цзя Шуньчао по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях.

1. Shank M., Jia S., Turovetsky V., Pirutin S. Damaging effect of carbon nanoparticles on the cell membranes of peritoneal macrophages of mice // Biophysical Reviews, Springer Verlag (Germany). – 2023. – Vol. 15. – P. 1721. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01150-w>. (JCI 0,77; 0,12/0,04 п.л.).

2. Цзя Ш., Шанк М.А., Пирутин С.К., Кондратьев П.А., Суворов О.А. Молекулярные механизмы токсичности и антимикробной активности серебра: модельное исследование наночастиц и ионов // Известия ДагГАУ. – 2024. – № 2(22). – С.354-64. DOI: 10.52671/26867591_2024_2. (1,27/0,32 п.л.).

3. Шанк М.А., Цзя Ш., Пирутин С.К., Кондратьев П.А., Суворов О.А. Оценка возможности использования нанотехнологической продукции в пищевых и биотехнологиях // Известия ДагГАУ. – 2024. – № 2(22). – С.364-373. DOI: 10.52671/26867591_2024_2. (1,16/0,29 п.л.).