

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2025

Оглавление

1. Введение	8
2. Обзор литературы	18
2.1. Микроводоросли.....	18
2.1.1 Краткий обзор микроводорослей. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики.....	18
2.1.2. Микроводоросль <i>Scenedesmus quadricauda</i> . Морфологические, физиологические и биохимические характеристики.....	21
2.1.3. <i>Scenedesmus quadricauda</i> как модельный объект для исследования токсического действия различных ксенобиотиков	24
2.2. Цианобактерии.....	27
2.2.1 Краткий обзор. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики.....	28
2.2.2. Особенности строения и работы фотосинтетического аппарата цианобактерий	29
2.2.3. Цианобактерия <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики.....	31
2.2.4. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 как модельный объект для исследования токсического действия различных ксенобиотиков	32
2.3. Спектральные методы в экологических исследованиях.....	34
2.3.1. Спектры поглощения и флуоресценции.....	34
2.3.2. Флуоресценция хлорофилла как показатель состояния фотосинтетических мембран фотосинтезирующих организмов. Механизмы генерации флуоресценции хлорофилла	38
2.3.3. Быстрая флуоресценция хлорофилла <i>a</i>	41
2.3.4. Метод комбинационного рассеяния света. Основные физические принципы и механизмы	43
2.3.5. Особенности использования спектроскопии комбинационного рассеяния в эколобиофизических исследованиях.....	48

2.4. Токсичность тяжелых металлов	53
2.4.1. Токсичность тяжелых металлов для водных фотосинтезирующих микроорганизмов.....	56
2.4.2. Механизмы токсичности серебра.....	58
2.4.3. Механизмы токсичности меди	64
2.4.4. Механизмы резистентности и толерантности водорослей к тяжелым металлам.....	70
2.5. Влияние различных физико-химических факторов на фотосинтезирующие организмы	75
2.5.1. Влияние pH среды на фотосинтезирующие организмы	76
2.5.2. Влияние температуры среды на фотосинтезирующие организмы	80
2.5.3. Влияние ультрафиолетового излучения на фотосинтезирующие организмы. Влияние на фотосинтетическую активность	84
2.5.4. Комплексное воздействие тяжелых металлов и других факторов	87
2.5.5. Синергетическое, антагонистическое и аддитивное действие комбинированных стрессовых факторов	89
2.5.6. Известные молекулярные и физиологические изменения и механизмы комбинированного стресса.....	91
2.6. Экологические исследования на модельных системах и организмах	93
2.6.1. Значение моделирования в экологических исследованиях	94
2.6.2. Живые модельные системы: Преимущества и ограничения при изучении экологических рисков.....	96
2.6.3. Использование модельных систем для прогнозирования экологических последствий.....	99
2.6.4. Как модельные системы имитируют или отклоняются от реальных условий окружающей среды	102

3. Материалы и методы исследования.....	105
3.1. Культивирование клеток и подготовка проб	105
3.1.1. Подсчет количества клеток в суспензии	106
3.2. Измерения абсорбции	106
3.3. Основная схема эксперимента	106
3.4. Исследование влияние меди и серебра на рост популяции микроводорослей	107
3.5. Измерения флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	107
3.5.1. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	107
3.5.2. Индукционные кривые (Переходные процессы) флуоресценции отдельных клеток.....	109
3.5.3. Световые кривые относительной скорости линейного электронного транспорта (rETR) и NPQ	110
3.5.4. Кривые затухания флуоресценции.....	110
3.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния света	111
3.7. Сканирующая электронная микроскопия	111
3.8. Статистическая обработка и представление полученных данных	112
4. Результаты и обсуждение	114
4.1. Изучение влияния ионов меди и серебра на размножение клеток <i>Scenedesmus quadricauda</i> и их фотосинтетическую активность.	114
4.2. Исследование воздействие ионов Cu^{2+} в разных концентрациях на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей <i>Scenedesmus quadricauda</i> с помощью спектральных методов при культивации водорослей с ионами Cu^{2+} в темновых и световых условиях.	118
4.2.1. Действие меди на пигментный состав в культуре микроводоросли <i>S. quadricauda</i> при инкубации на свету	119

4.2.2. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в световых условиях.....	123
4.2.3. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в световых условиях.....	125
4.2.4. Действие меди на пигментный состав в культуре микроводоросли <i>S. quadricauda</i> при инкубации в темноте.....	132
4.2.5. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в темновых условиях.....	135
4.2.6. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в темновых условиях.....	138
4.2.7. Особенности действия меди на индукцию быстрой флуоресценции в клетках культуры микроводоросли <i>S. quadricauda</i> . OJIP-кривые и их параметры.....	144
4.2.8. Влияние меди на характер световых кривых относительной скорости линейного электронного транспорта (rETR) и нефотохимическое тушение NPQ	151
4.2.9. Влияние меди на параметры кривых затухания флуоресценции в пико- и наносекундном диапазоне в суспензии клеток культуры микроводоросли <i>S. quadricauda</i>	152
4.2.10. Влияние меди на параметры кривых затухания флуоресценции в пико- и наносекундном диапазоне на отдельных клетках	155
4.2.11. Обобщение результатов по действию меди на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей <i>Scenedesmus quadricauda</i> с помощью методов регистрации флуоресценции хлорофилла при культивации водорослей с ионами Cu^{2+} в темновых и световых условиях.....	158

4.3. Исследование воздействие ионов Ag^+ в разных концентрациях на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей <i>Scenedesmus quadricauda</i> с помощью методов регистрации флуоресценции хлорофилла при культивации водорослей с ионами Ag^+ в темновых и световых условиях	160
4.3.1. Действие серебра на пигментный состав в культуре микроводоросли <i>S. quadricauda</i> при инкубации на свету	161
4.3.2. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в световых условиях.....	164
4.3.3. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в световых условиях.....	167
4.3.4. Действие серебра на пигментный состав в культуре микроводоросли <i>S. quadricauda</i> при инкубации в темновых условиях..	175
4.3.5. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в темновых условиях.....	177
4.3.6. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках <i>S. quadricauda</i> при их инкубации в темновых условиях.....	180
4.3.7. Особенности действия серебра на индукцию быстрой флуоресценции в клетках культуры микроводоросли <i>S. quadricauda</i> . ОЛР-кривые и их параметры.....	187
4.3.8. Влияние серебра на характер световых кривых относительной скорости линейного электронного транспорта (rETR) и нефотохимическое тушение NPQ	191
4.3.9. Влияние серебра на параметры кривых затухания флуоресценции в пико- и наносекундном диапазоне в суспензии клеток культуры микроводоросли <i>S. quadricauda</i>	193

4.3.10. Обобщение результатов по действию серебра на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей <i>Scenedesmus quadricauda</i> с помощью методов регистрации флуоресценции хлорофилла при культивации водорослей с ионами серебра в темновых и световых условиях.	195
4.4. Изучение влияния ионов меди и серебра на клетки <i>Scenedesmus quadricauda</i> с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света	197
4.5. Исследование влияния ионов меди и серебра на морфологию клеточной стенки микроводорослей <i>Scenedesmus quadricauda</i> с помощью метода сканирующей электронной микроскопии.....	200
4.6. Влияние ионов меди и серебра на индукцию быстрой флуоресценции в клетках культуры цианобактерий <i>Synechocystis sp. PCC6803</i> . ОЛР-кривые	202
5. Заключение.....	206
6. Выводы	207
7. Список сокращений и условных обозначений.....	210
8. Список цитируемой литературы	211

1. Введение

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, повреждениях 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 (F_v/F_m), индекс производительности (PIABS), отношения потоков поглощения (ABS/CSM), захвата (TR_o/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 ОЖР 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 Tayyab 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 Tayyab 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 отличаться 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.

Цель 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 а 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, пластохинноновый комплекс, цитохромный комплекс, FSI), 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

Теоретическая значимость:

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.

Развиты представления о роли клеточной гетерогенности в оценке токсичности в популяциях микроорганизмов.

Практическая значимость:

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 современных 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 и опубликованы в рецензируемых международных и отечественных журналах, входящих в поисковые базы данных: РИНЦ, Scopus и Web of Science.

Апробация состоялась на заседании кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (9 сентября 2024 г.; протокол № 11).

Список публикаций:

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 квартиль, 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. 24(8), 6947. P. 1-35. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24086947>. (Q1, IF- JIF -4,9, 4,04/0,81).

2. Sergey Pirutin; Dmitrii Chaikovskii; Mikhail Shank; Mikhail Chivarzin; **Shunchao Jia**; Alexander Yusipovich; Oleg Suvorov; Yuehong Zhao; Dmitry Bezryadnov; Andrey Rubin. Investigation of cell damage induced by silver nanoparticles in a model cell system. // *Pharmaceutics*. 2025, 17, 398. pp. 1-29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17040398>. (Q1, JIF - SJR -4,9, 3,35/0,37 п.л.).

3. С. К. Пирутин, М. А. Шанк, **Ш. Цзя**, И. В. Конюхов, Д. А. Тодоренко, Р. Н. Червицов, П. В. Фурсова, Л. Ф. Кабашникова, Т. Ю. Плюснина, С. С. Хрущев, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин. Комплексный анализ воздействия ионов меди на первичные процессы фотосинтеза пресноводной микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* по результатам измерений флуоресценции хлорофилла в суспензии и на одиночных клетках. // *Компьютерные исследования и моделирование*. 2025. Т. 17 №2. С.293-321. (Q4, IF-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, pp. 1425–1861. P. 1721. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01150-w>. (Q1, IF 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. – Т. 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. – Т. 2(22). С.364-373. DOI: 10.52671/26867591_2024_2. (1,16/0,29 п.л.).

Список конференций:

1. Shank M., **Jia S.** "Study of the Cytotoxicity of Carbon Nanoparticles." Presented at the XXX International Scientific Conference for Students, Postgraduates, and Young Scientists "Lomonosov-2023", Moscow, 2023.

2. Shank M., **Jia S.** "Study of the Cytotoxicity of Carbon Nanoparticles." Published in the materials of the International Youth Scientific Forum "Lomonosov-2023", Moscow: MAX Press, 2023. ISBN 978-5-317-06952-0.

3. Shank Mikhail, **Jia Shunchao**, Lin Denglei. "Cytotoxic Effect of Carbon Nanoparticles." Presented at the 2023 International Conference "Current Trends and Achievements in Life Sciences", Shenzhen, 2023.

4. Shank Mikhail, **Jia Shunchao**, Lin Denglei. "Researching the Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Model Cell Systems." Presented at the 2023 International Conference "Current Trends and Achievements in Life Sciences", Shenzhen, 2023.

5. **Jia Shunchao**, Lin Denglei. "Investigation Using Spectral Methods of the Toxic Effects of Ag and Cu Salts on Model Systems Based on Green Algae *Scenedesmus quadricauda* and Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803." Presented at the International Scientific Conference for Students, Postgraduates, and Young Scientists "Lomonosov-2023" at the MSU-PPI University in Shenzhen, April 10-21, 2023.

6. Shank M.A., **Jia S.**, Turovetsky V.B., Pirutin S.K. "Damaging Effect of Carbon Nanoparticles on Cell Membranes of Peritoneal Macrophages in Mice." Published in the VII Congress of Biophysicists of Russia. Collection of Scientific Papers, 2023. Vol. 2, pp. 122-123. DOI:10.26297/SbR6.2023.001.

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.

2. Обзор литературы

2.1. Микроводоросли

Микроводоросли, как ключевые первичные продуценты в водных экосистемах, играют фундаментальную роль в поддержании глобальных биогеохимических циклов, включая углеродный и азотный (Falkowski, 2012; Field et al., 1998). Их высокая чувствительность к изменениям окружающей среды, таким как загрязнение тяжелыми металлами, делает их важными биоиндикаторами экологического состояния водоемов (Torres et al., 2008; Kumar et al., 2015). В экотоксикологических исследованиях микроводоросли служат маркерными организмами для оценки экологических рисков, что подчеркивает значимость изучения их фотохимических реакций в контексте загрязнения водных экосистем (Wang et al., 2021).

2.1.1 Краткий обзор микроводорослей. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики

Микроводоросли представляют собой полифилетическую группу фотосинтезирующих организмов, включающую одноклеточные и колониальные формы, обитающие в пресноводных и морских экосистемах (Raven & Giordano, 2014). Морфологически они варьируются от одиночных клеток, таких как *Chlorella vulgaris*, до нитчатых или колониальных структур, таких как *Anabaena* или *Pediastrum* (Graham et al., 2009). Авторами Hessen et al., 2002 показано, что морфологическая пластичность микроводорослей позволяет им адаптироваться к изменениям освещенности и температуры, что обусловлено вариабельностью клеточных стенок и пигментных комплексов. В исследовании Lüring & Van Donk, 1997 установлено, что некоторые виды изменяют форму и размер клеток в ответ на биотические факторы, что отражает их экологическую адаптивность.

Физиологические особенности микроводорослей определяются высокой эффективностью фотосинтеза, обусловленной наличием хлоропластов с пигментами, включая хлорофиллы *a* и *b* и каротиноиды (Falkowski & Raven, 2007). Эти пигменты обеспечивают поглощение света в

широком спектральном диапазоне, что делает спектральные экспресс-биофизические методы, такие как анализ флуоресценции хлорофилла (ОЛР-кривые), эффективными для изучения фотохимических процессов (Strasser et al., 2004). Авторами Kalaji et al., 2014 продемонстрировано, что ОЛР-кривые позволяют количественно оценивать эффективность фотосистемы II (ФСII), выявляя нарушения в электронном транспорте под воздействием стрессоров, таких как тяжелые металлы.

Биохимически микроводоросли характеризуются сложной системой антиоксидантной защиты, включающей ферменты, такие как супероксиддисмутаза и каталаза, а также низкомолекулярные метаболиты, включая глутатион и аскорбат (Pinto et al., 2003). Авторами Torres et al., 2008 сообщается, что эти механизмы нейтрализуют активные формы кислорода (АФК), образующиеся при окислительном стрессе, вызванном тяжелыми металлами. В исследовании Navarro et al., 2008 показано, что ионы Ag^+ , не имеющие физиологической роли, проявляют высокую токсичность, нарушая ферментативные процессы и структуру хлоропластов. Авторами Kumar et al., 2015 подчеркивается, что биохимические ответы микроводорослей на тяжелые металлы варьируются в зависимости от вида и условий воздействия.

Фотосинтетический аппарат микроводорослей локализован в мембранах хлоропластов, преимущественно в тилакоидах, и включает фотосистемы I (ФСI) и ФСII, цитохромный комплекс b_6f , АТФ-синтазу и пигментно-белковые комплексы (Falkowski & Raven, 2007). Ниже представлена схема строения фотосинтетического аппарата (рисунок 2.1.1).

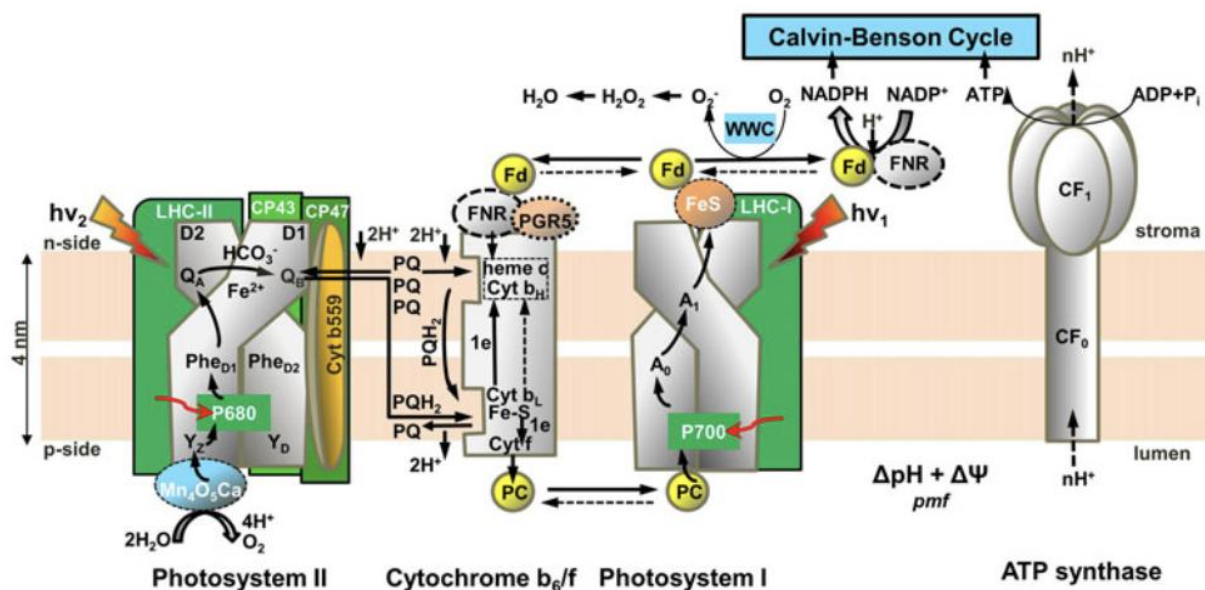


Рисунок 2.1.1. Схема строения фотосинтетического аппарата, представляющая собой четыре ключевых белковых комплекса, встроенных в тилакоидную мембрану фотосинтезирующих организмов: фотосистема II (начинает процесс фотосинтеза, поглощая свет и инициируя расщепление воды с выделением кислорода); цитохром b_6/f комплекс (передает электроны от ФСII к ФСI и способствует образованию протонного градиента); фотосистема I (использует свет для дальнейшего возбуждения электронов, которые затем используются для восстановления $NADP^+$ до $NADPH$); АТФ-синтаза (использует протонный градиент для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата). Все комплексы работают согласованно, обеспечивая преобразование световой энергии в химическую, необходимую для фиксации углекислого газа в цикле Кальвина (рисунок модифицирован по Stirbet & Govindjee, 2012).

Автором Blankenship, 2002 показано, что ФСII отвечает за фотолиз воды, генерируя электроны, протоны и кислород, тогда как ФСI катализирует перенос электронов на $NADP^+$, образуя НАДФН. В исследовании Nelson & Ben-Shem, 2004 установлено, что светособирающие комплексы (LHC) усиливают поглощение света, передавая энергию возбуждения к

реакционным центрам ФСII (P680) и ФСI (P700). Авторами Croce & van Amerongen, 2014 продемонстрировано, что каротиноиды в ЛНС выполняют защитную функцию, рассеивая избыточную энергию и предотвращая фотоокислительное повреждение. Цитохромный комплекс b6f обеспечивает электронный транспорт между ФСII и ФСI, поддерживая протонный градиент для работы АТФ-синтазы (Cramer et al., 2011). В исследовании Kalaji et al., 2014 подчеркивается, что нарушения в ФСII, вызванные тяжелыми металлами, такими как Cu^{2+} и Ag^+ , могут быть количественно оценены с помощью ОЛР-кривых, что подтверждает значимость спектральных методов для изучения фотохимических процессов.

2.1.2. Микроводоросль *Scenedesmus quadricauda*. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики

Scenedesmus quadricauda — пресноводная зеленая микроводоросль из класса Chlorophyceae, широко распространенная в эвтрофных водоемах и используемая в биотехнологии и экотоксикологии благодаря своей адаптивности и высокой продуктивности (Hegewald, 1997; Korozi et al., 2023). Морфологически *S. quadricauda* характеризуется колониальной организацией, образуя ценобии из 2–8 клеток, чаще всего 4, расположенных линейно (Trainor, 1996). Клетки цилиндрической или веретеновидной формы, длиной 10–22 мкм, имеют жесткую клеточную стенку, состоящую из целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых слоев, обеспечивающих устойчивость к внешним стрессорам (Trainor, 1996). В исследовании Wong et al., 2015 установлено, что под воздействием питательного стресса, например, дефицита азота, длина клеток увеличивается до 22,5 мкм, а ценобии могут распадаться на одноклеточные формы, свидетельствуя о морфологической пластичности (Lürling & Van Donk, 1997). На рисунке 2.1.2 представлены некоторые варианты ценобий *Scenedesmus quadricauda*.

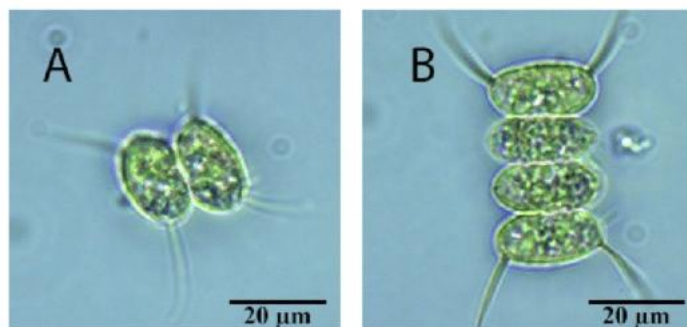


Рисунок 2.1.2. Ценобии *Scenedesmus quadricauda* из двух клеток (А) и четырех (В) (рисунок модифицирован по (Nikiforov-Nikishin et al., 2021)).

Scenedesmus quadricauda демонстрирует высокую способность адаптироваться к изменяющимся условиям среды. Ее сложные хлоропласты содержат многослойные тилакоидные мембраны, которые являются основными участками световой фазы фотосинтеза. В хлоропластах сосредоточено множество фотосинтетических пигментов, таких как хлорофилл а и b, которые не только поглощают свет, но и передают энергию и электроны в реакционные центры фотосинтеза (Johnson, 2016). *Scenedesmus quadricauda* способна регулировать содержание хлорофилла и активность ФСII, чтобы адаптироваться к изменениям интенсивности света, тем самым поддерживая высокую эффективность фотосинтеза в изменяющихся световых условиях.

Физиологически *S. quadricauda* отличается высокой фотосинтетической активностью, обусловленной эффективной работой ФСI и ФСII (Ouyang et al., 2012). Авторами Korozi et al., 2023 продемонстрировано, что в условиях миксотрофного роста с использованием красного света максимальная скорость роста достигает $0,89 \text{ день}^{-1}$, а биомасса — $1,86 \text{ г/л}$, что превосходит гетеротрофные условия. В исследовании Napiórkowska-Krzebietke & Stawecki, 2019 установлено, что параметр F_v/F_m (максимальная квантовая эффективность ФСII) остается стабильным при умеренных стрессах, но снижается при воздействии высоких концентраций никеля (10 мг/л), что указывает на ингибирование фотохимических процессов. *S. quadricauda*

способна к миксотрофному метаболизму, используя органические источники углерода, такие как глюкоза или ксилоза, что повышает накопление липидов до 33,1% от сухой массы (Song & Pei, 2018).

Scenedesmus quadricauda обладает мощными антиоксидантными и метаболическими адаптационными способностями. Особенно при воздействии таких загрязнителей, как тяжелые металлы (например, Cu^{2+} и Ag^+), водоросль активирует антиоксидантные ферменты для борьбы с окислительным стрессом, уменьшая накопление активных форм кислорода (АФК) (Foyer & Shigeoka, 2011). Эти антиоксидантные ферменты нейтрализуют избыток АФК, предотвращая ПОЛ и окислительное повреждение белков, поддерживая редокс-баланс клетки.

Биохимически *S. quadricauda* богата белками (8–56%), углеводами (10–18%) и липидами (12–14%), что делает ее перспективной для биотехнологии (Wong et al., 2015). Авторами Pancha et al., 2015 показано, что при азотном голодании содержание липидов возрастает до 27-34%, а углеводов — до 46-50%, что связано с активацией путей синтеза нейтральных липидов и углеводов. В исследовании Kafil et al., 2021 установлено, что при воздействии Cr(VI) (5–10 мг/л) увеличивается продукция мононенасыщенных жирных кислот (MUFA), таких как C16:1 и C18:1, тогда как содержание белков снижается (Maeng et al., 2018). Антиоксидантная система, включающая супероксиддисмутазу и каталазу, активируется при стрессе, вызванном тяжелыми металлами, нейтрализуя активные формы кислорода АФК (Maeng et al., 2018). В исследовании Korozi et al., 2023 подчеркивается, что накопление каротиноидов, таких как лютеин, возрастает при миксотрофном культивировании под желтым светом, что связано с защитой от фотоокисления.

Суммируя информацию выше, большинство исследований фокусируются на общих физиологических и биохимических маркерах стресса, таких как рост и пигментный состав (Pinto et al., 2003). Однако данных о воздействии тяжелых металлов, таких как Cu^{2+} и Ag^+ , на первичные

фотохимические реакции, изученные с помощью биофизических методов, и учитывающих множество параметров, не так много (Kalaji et al., 2014).

2.1.3. *Scenedesmus quadricauda* как модельный объект для исследования токсического действия различных ксенобиотиков

Scenedesmus quadricauda является признанным модельным объектом в экотоксикологических исследованиях благодаря своей экологической значимости, высокой чувствительности к ксенобиотикам и простоте культивирования (Hegewald, 1997; Korozi et al., 2023). *S. quadricauda* включена в международные протоколы тестирования токсичности (например, OECD Test No. 201), так как ее физиологические и биохимические ответы, включая рост, фотосинтез и антиоксидантную активность, отражают воздействие широкого спектра загрязнителей, таких как тяжелые металлы, пестициды и наночастицы. В исследовании Lürling & Van Donk, 2003 показано, что морфологическая пластичность вида, включая образование шипов на ценобиях под стрессом, делает его удобным для изучения экологических взаимодействий. Высокая репродуктивная способность и короткий жизненный цикл (24–48 часов) обеспечивают воспроизводимость экспериментов (Trainor, 1996).

Высокая чувствительность к стрессовым факторам окружающей среды и способность к быстрой реакции делают ее идеальным инструментом для биомониторинга. *Scenedesmus quadricauda* активно используется для оценки токсичности тяжелых металлов, которые представляют серьезную угрозу водным экосистемам из-за их биодоступности и способности накапливаться в биоте (Kumar et al., 2015). При воздействии тяжелых металлов, таких как Cu^{2+} и Ag^+ , ингибируются фотосинтез, в частности за счет нарушения функций фотосистемы II, что приводит к блокировке цепи переноса электронов и снижению общей эффективности фотосинтеза (Kalaji et al., 2017).

Кроме того, воздействие тяжелых металлов увеличивает проницаемость клеточных мембран *Scenedesmus quadricauda*, вызывая дисбаланс ионов

внутри и снаружи клетки. Особенно при высокой концентрации Cu^{2+} или Ag^+ значительно повышается уровень ионов кальция в клетке, поскольку эти металлы нарушают работу кальциевых каналов на клеточных мембранах, что приводит к большому притоку кальция внутрь клетки (Foyer & Shigeoka, 2011). В ответ на эти стрессы *Scenedesmus quadricauda* увеличивает активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза, которые нейтрализуют АФК и уменьшают повреждение клеточных мембран и фотосистемы, защищая функции клетки (Park et al, 2020). В исследовании Wang et al., 2019 установлено, что ионы серебра (Ag^+), высвобождаемые из наночастиц, проявляют высокую токсичность для близкого вида *Scenedesmus obliquus*, снижая пигментный состав (хлорофилл а и b) на 20–30% и нарушая мембранную целостность, что предполагает схожие эффекты для *S. quadricauda*. В исследовании Yong et al. (2019) изучались физиологические и метаболические реакции пресноводной микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* на токсичность никеля при температурах 25 °C и 35 °C,

Токсичность тяжелых металлов для *S. quadricauda* связана с их способностью генерировать АФК, вызывающие окислительный стресс и повреждение клеточных структур (Pinto et al., 2003). Авторами Dao & Beardall, 2020 показано, что Cu^{2+} ингибирует электронный транспорт в ФСII, снижая эффективность фотоллиза воды, что подтверждается уменьшением параметра фФСII (квантовая эффективность ФСII) на 15–20% при концентрации 0,5 мг/л. Авторами Leong & Chang, 2020 подчеркивается, что Ag^+ в концентрациях 0,01–0,1 мг/л вызывает апоптозоподобные изменения в *S. quadricauda*, включая фрагментацию ДНК и потерю митохондриального мембранного потенциала.

Помимо тяжелых металлов, *S. quadricauda* используется для оценки токсичности органических ксенобиотиков. Авторами Chen et al., 2019 показано, что гербицид атразин в концентрации 0,1 мг/л снижает скорость роста *S. quadricauda* на 40% за 96 часов, нарушая синтез хлорофилла и

активность фермента RuBisCO. Авторами Song & Pei, 2018 продемонстрировано, что *S. quadricauda* способна биodeградировать некоторые органические загрязнители, такие как фенолы, благодаря активации ферментов детоксикации, что подчеркивает ее потенциал в биоремедиации.

Scenedesmus quadricauda также применяется для изучения токсичности наночастиц, которые становятся все более распространенными загрязнителями (Wang et al., 2019). Авторами Li et al., 2020 показано, что наночастицы оксида цинка (ZnO NPs, 50 мг/л) вызывают агрегацию клеток *S. quadricauda*, снижая биомассу на 25% и нарушая мембранную проницаемость. В исследовании Zhang et al., 2023 установлено, что наночастицы серебра (AgNPs, 0,1 мг/л) индуцируют окислительный стресс, повышая уровень малондиальдегида (MDA) на 50%, что указывает на повреждение липидных мембран. Эти эффекты частично обусловлены высвобождением ионов Ag^+ , что перекликается с исследованиями тяжелых металлов (Leong & Chang, 2020). В исследовании Shrivastava et al. (2022) была оценена токсичность химически синтезированных наночастиц оксида цинка на микроводоросль *Scenedesmus quadricauda*, выявив значительное ингибирование роста при концентрации 100 мг/л после 120 часов воздействия, что подчёркивает потенциал этого вида в качестве биоиндикатора для оценки нанотоксичности в водных экосистемах.

S. quadricauda является универсальной моделью для изучения токсичности ксенобиотиков, однако большинство исследований сосредоточено на общих маркерах, таких как рост, пигментный состав и антиоксидантная активность (Napiórkowska-Krzebietke et al., 2019; Chen et al., 2019). Данные о воздействии тяжелых металлов, таких как Cu^{2+} и Ag^+ , на первичные фотохимические реакции, изученные с помощью биофизических методов (например, ОЛП-анализ), остаются ограниченными (Dao & Beardall, 2020; Kalaji et al., 2014). Авторами Korozi et al., 2023 подчеркивается необходимость интеграции спектральных методов для оценки нарушений в

ФСII, что особенно актуально для разработки биоиндикаторов загрязнения. Пробелы в изучении молекулярных механизмов токсичности, включая апоптоз и генотоксичность, также требуют дальнейших исследований (Leong & Chang, 2020). Настоящее исследование направлено на восполнение этих пробелов, применяя ОЛР-анализ для изучения фотохимических нарушений, вызванных Cu^{2+} и Ag^+ в *S. quadricauda*, что позволит углубить понимание механизмов токсичности и разработать надежные инструменты для экологического мониторинга.

Раскрытие механизмов ответа *Scenedesmus quadricauda* на различные загрязнители и стратегий адаптации может помочь в разработке более разнообразных технологий мониторинга и восстановления окружающей среды. Таким образом, морфологические, физиологические и биохимические характеристики *Scenedesmus quadricauda* делают её удобным модельным организмом для исследований воздействия загрязнителей окружающей среды, особенно тяжелых металлов.

2.2. Цианобактерии

Цианобактерии (Cyanobacteria) представляют собой древнейшие формы жизни и в современной классификации рассматриваются в ранге отдела внутри домена Бактерии. К ним относятся сравнительно крупные и сложно организованные грамотрицательные бактерии, способные в отличие от остальных к оксигенному фотосинтезу. В силу данных особенностей цианеи ранее причислялись к растениям под общим названием сине-зеленые водоросли (Cyanophyta). В рамках устаревшего таксономического подхода было описано около 1000 видов, объединенных в 175 родов, тогда как современные методы исследования позволили свести их к 400 видам, подразделяемым на 5 порядков (Boone et al., 2012). Возникновение цианобактерий в раннем докембрии явилось одной из важнейших вех эволюции (Schopf, 1996). Биосферное значение цианобактерий огромно. Будучи на тот момент единственными фотоавтотрофными организмами,

около 2,4 млрд. лет назад они стали творцами кислородной атмосферы планеты. Современные цианеи производят от 20 до 40% кислорода по разным оценкам.

2.2.1 Краткий обзор. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики

Цианобактерии обладают максимальным морфологическим разнообразием среди прокариотов. Бывают одиночные, колониальные и многоклеточные (нитчатые) формы, число клеток в которых может колебаться в широких пределах. Размер и форма самих клеток также крайне вариативны – от 0,5 до 100 мкм (Пиневич, 2006), от шаровидной до сердцевидной и грушевидной (Голлербах и др., 1953). Полиморфизм цианобактерий таков, что их объединяет, главным образом, наличие гликокаликса и отсутствие жгутика. Жесткие клеточные стенки, состоящие из слоя пептидогликана муреина толщиной 2 – 200 нм и наружной мембраны, выполняют опорную и защитную функции.

Нитевидные цианеи существуют в виде изолированных нитей либо соединены слизью. Колония представляет собой стабильное образование, бесформенное либо в той или иной мере упорядоченное. Известны шаровидные, пластинчатые, цилиндрические, эллипсоидные и др. колонии, которые могут разрастаться до нескольких сантиметров (Кондратьева, 1996). Слизистые обертки, различающиеся по составу и свойствам, могут быть как аморфными, так и с четкими контурами, слоистой или гомогенной структурой и подразделяются на чехлы, капсулы и слизи (De Philippis, Vincenzini, 1998, 2003). Слизь содержит экзополисахариды, состоящие из нескольких нейтральных сахаров, часто связанных с аминами, белками и жирными кислотами (Chug, Mathur, 2013). С помощью слизи цианеи передвигаются (Li et al., 2002).

Согласно ряду молекулярно-филогенетических исследований, многоклеточность цианобактерий возникла примерно тогда же, что и

кислородный фотосинтез (Schirrmeister et al., 2013). Многие цианобактерии, в особенности, живущие в почве, ведут азотфиксирующую активность посредством фермента нитрогеназы. У нитчатых цианобактерий процесс азотфиксации осуществляется в специализированных толстостенных клетках – гетероцистах. Связанный азот складывается в гранулах цианофицина или выделяется в виде глутаминовой кислоты. Будучи облигатными фототрофами, цианобактерии, тем не менее, при отсутствии света прибегают к расщеплению гликогена в окислительном пентозофосфатном цикле и в ходе гликолиза.

2.2.2. Особенности строения и работы фотосинтетического аппарата цианобактерий

Фотосинтетическая активность, присущая цианобактериям, сходна с таковой у растений, но имеет ряд особенностей. В рамках симбионтной теории возникновения фотосинтеза эволюционными предками хлоропластов растений полагают одноклеточных цианобактерий, которые отделились от своего близкого родственника (*Gloeomargarita*) порядка 2,1 млрд. лет назад (Sánchez-Baracaldo et al., 2017; Ishikawa, Kawai-Yamada, 2019).

Фотосинтетический аппарат цианобактерий характеризуется особой пространственной организацией электрон-транспортных цепей, своеобразным светособирающим комплексом, возможностью бескислородного фотосинтеза, а также наличием «биологических часов». Клетка цианеи снабжена замкнутой, хорошо развитой системой внутриплазматических мембран (тилакоидов), на которых запускаются использующие солнечную энергию электрон-транспортные цепи фотосинтеза, включающие фотосистему II, b_6f -цитохромный комплекс и фотосистему I (PSI) (Капун, Сétif, 2014). Конечный акцептор электронов – ферредоксин, донор электронов – вода, как и у растений (ФС II). При неблагоприятных условиях электроны могут поступать и от других, менее энергетически выгодных, источников, таких как восстановленные соединения серы, водород, некоторые сахара, органические кислоты (ФС I) (Wang et al., 2012). Вторая фотосистема в это время отключается.

Светособирающие комплексы образованы пигментами фикобилинами, локализованными в фикобилисомах (Blankenship, 2002). Так называемые «биологические часы» состоят из трех белков, участвующих в циклических биохимических реакциях. В темновую фазу фотосинтеза накопленная энергия используется для производства органических веществ из атмосферного углекислого газа. Возможности переключаться с одной схемы фотосинтеза на другую обеспечивает цианобактериям гибкость метаболизма, позволяющую выживать в самых жестких условиях (Yoon et al., 2004).

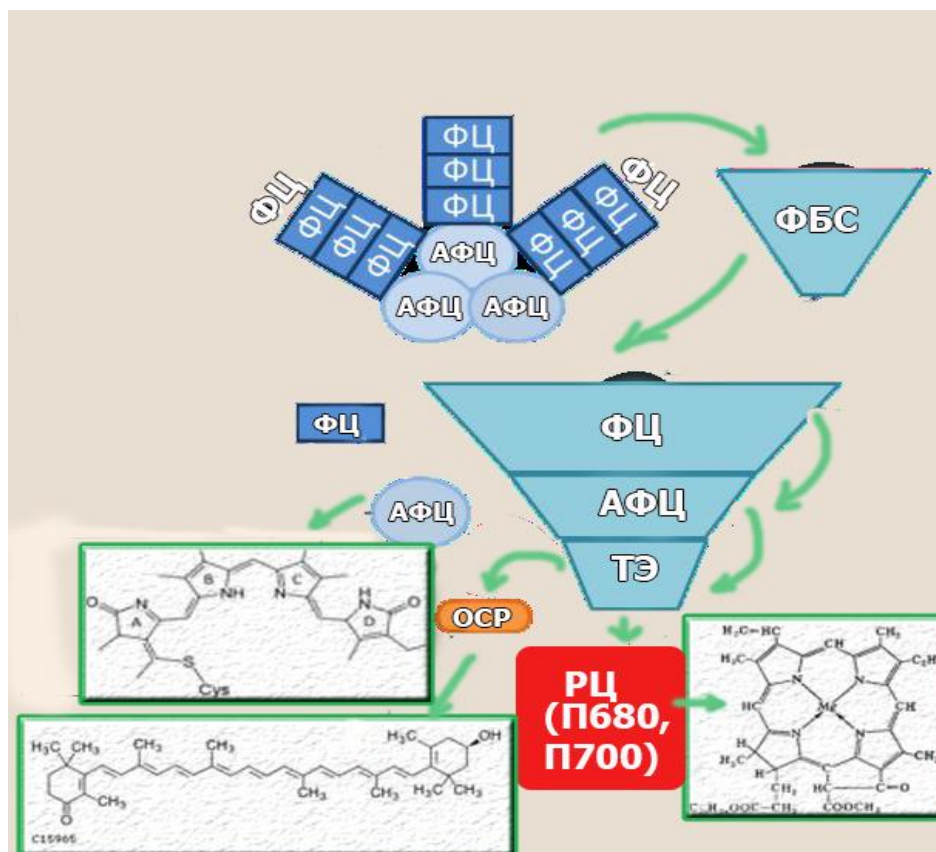


Рис. 2.2.1. Строение антенного комплекса и реакционного центра фотосинтетического аппарата цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* (ФЦ – фикобилипротеин фикоцианин; АФЦ – фикобилипротеин аллофикоцианин; ТЭ – терминальные эмиттеры; ОСР – оранжевый каротиноидный белок; FRP – белок, восстанавливающий флуоресценцию; ФБС – фикобилисома, состоящая из фикобилипротеинов; РЦ (P680, P700) – фотосинтетические реакционные центры) (по Клементьев, 2019, изменено).

2.2.3. Цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803. Морфологические, физиологические и биохимические характеристики

Synechocystis sp. PCC 6803 представляет собой штамм пресноводных одноклеточных цианобактерий рода *Synechocystis*. Его отличительной особенностью является широкая экологическая пластичность и вариативность метаболизма. Микроорганизм способен как к фототрофному питанию при осуществлении кислородного фотосинтеза в световую фазу, так и к гетеротрофному росту путем гликолиза и окислительного фосфорилирования в темновую фазу (Heidorn et al., 2011). Однако для нормальной жизнедеятельности этой бактерии требуется 5-15 минут коротковолнового освещения в сутки. Механизм данного явления пока до конца не ясен (Anderson, McIntosh, 1991). Смена фотосинтетической активности регулируется с помощью так называемых циркадных ритмов (Dong et al., 2008).

Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 впервые был выделен в 1968 г. из воды одного из калифорнийских озер (Stanier et al., 1971) и с тех пор изучается в лабораториях по всему миру. Последующие лабораторные штаммы могут отличаться от исходного степенью подвижности, чувствительностью к глюкозе и т.д. В целом, термопреферендум этого вида находится в диапазоне 32 – 38°C. Культивируют его на агар-агаре или в жидком субстрате, в качестве которого обычен соляной раствор с pH 7 – 8.5, а оптимальной интенсивностью света признано значение 50 мкмоль фотон м⁻² с⁻¹ (Heidorn et al., 2011).



Рис. 2.2.2. Внешний вид *Synechocystis* sp. (<https://plantlet.org/lab-gallery-biodiversity>).

Synechocystis sp. PCC 6803 стал первым фотосинтезирующим организмом с полностью расшифрованным геномом. По ранним работам его геном содержит до 12 копий одной хромосомы, трех небольших плазмид и четырех больших плазмид (Kaneko et al., 2003). Позже было найдено, что число копий может достигать 218 (Griese et al., 2011). Следовательно, полиплоидность вариабельна и зачастую зависит от конкретных условий. В целом, исследования различных штаммов *Synechocystis* демонстрируют признаки недавней микроэволюции (Trautmann et al., 2012).

2.2.4. *Synechocystis* sp. PCC 6803 как модельный объект для исследования токсического действия различных ксенобиотиков

Цианобактерии рода *Synechocystis* нашли широкое применение в качестве модельного объекта в исследованиях различных метаболических процессов (Зинченко и др., 2008). При этом штамм PCC 6803 стал одним из наиболее востребованных, что обусловлено как высокой степенью его изученности, так и простотой культивирования. В литературных источниках освещались стрессоустойчивость *Synechocystis* sp. PCC 6803, взаимодействие с тяжелыми металлами, липидный обмен и пр. (Лось, 2010; Sinetova, Los, 2016; Lai et al., 2018).

Сходный с растениями фотосинтетический аппарат и строение мембран

делают этот вид удобной моделью при исследовании процессов фотосинтеза и фототаксиса (Yu et al., 2013). В частности, для изучения кислородного фотосинтеза получили распространение миксотрофно выращенные мутанты *Synechocystis* sp. PCC 6803, у которых отсутствует PSI (Δ PSI). Как выяснилось, они способны к чистому выделению кислорода под действием света и при наличии глюкозы в течение получаса (Wang et al., 2012). Пул пластохинонов восстанавливается ФСII и далее окисляется неопределенным акцептором электронов, который не включает сайт пластохинолоксидазы цитохрома b_6f .

Отдельное направление составили исследования стрессовых реакций *Synechocystis* на токсическое воздействие ионов тяжелых металлов и других ксенобиотиков. Тяжелые металлы, присутствующие почти повсеместно, вызывают у организмов ответную реакцию в виде изменений пространственной организации внутри клеток (Jurado et al., 1987; Rai et al., 1990). При этом разные штаммы одного вида могут проявлять разную чувствительность, что важно учитывать при проведении таких действий, как экологический мониторинг. Показано, что основную роль при ответной адаптации микроорганизмов играют специфические мембранные липиды и стрессовые протеины (Glatz et al., 1999).

Выяснено, что устойчивость цианей к ионам металлов во многом обусловлена структурой протеиновых и полисахаридных слоев в клеточной стенке, которые связывают ионы металлов. Накопление ксенобиотиков на поверхности клетки изменяет ее проницаемость и минерализирует наружный чехол, подавляя рост популяции (Foster et al., 1988; Voloshko et al., 2001; Laube et al., 1980). Штамм PCC 6803 проявляет значительную чувствительность к ксенобионтам, но меньшую, чем отдельные штаммы CALU (Полозова и др., 2017). По данным авторов, степень токсичности солей металлов для PCC 6803 больше зависела от температуры, нежели от освещенности.

2.3. Спектральные методы в экологических исследованиях

В экологических исследованиях спектральные методы являются ключевыми инструментами для анализа биологических образцов и параметров окружающей среды. Измеряя поглощение, флуоресценцию и рассеяние света различных длин волн в образце, спектральные методы могут предоставить информацию о составе, структуре и функциях биологических веществ (Погосян С.И. и др., 2017; Заядан Б.К. и др., 2020; Pirutin S.K. et al., 2023). При изучении реакции фотосинтезирующих организмов на загрязнение тяжелыми металлами и другие факторы окружающей среды спектральные методы широко применяются для мониторинга и оценки состояния здоровья водных растений, особенно зеленых водорослей и цианобактерий, их фотосинтетической функции и адаптационных способностей.

2.3.1. Спектры поглощения и флуоресценции

Спектры поглощения и флуоресценции являются распространенными спектральными методами для исследования фотосинтетических пигментов, состояния фотосинтетических мембран и их реакции на стрессовые факторы окружающей среды (Маторин Д.Н. и др., 2012; Маторин Д.Н. и др., 2010). Анализируя поглощение и излучение света определенных длин волн биологическим образцом, эти спектральные методы позволяют выявить изменения в фотосинтетических функциях и структурном состоянии организма (Антал Т.К. и др., 2009).

2.3.1.1. Основные принципы спектров поглощения и их применение в экологических исследованиях

Спектры поглощения основаны на способности фотосинтетических пигментов (таких как хлорофиллы и каротиноиды) поглощать свет определенных длин волн. Когда свет падает на биологический образец, молекулы различных пигментов поглощают свет разных длин волн, создавая уникальный спектр поглощения организма. Для фотосинтезирующих организмов, особенно зеленых водорослей и цианобактерий, спектры

поглощения являются важными показателями для оценки эффективности фотосинтеза и функционального состояния организмов (Elena Cavalletti, et al. 2022).

Хлорофиллы *a* и *b* являются основными фотосинтетическими пигментами, которые имеют выраженные пики поглощения в красной (650-680 нм) и синей (430-460 нм) областях спектра. Анализ изменений в интенсивности и положении этих пиков поглощения позволяет определить изменения состояния и функциональности фотосинтетической системы. Например, под воздействием загрязнителей тяжелыми металлами (такими как Cu^{2+} и Ag^{+}) структура фотосинтетических мембран может повреждаться, что приводит к снижению интенсивности пиков поглощения хлорофилла, указывая на снижение эффективности фотосинтеза (Kalaji et al., 2017). Кроме того, мониторинг пиков поглощения каротиноидов (в диапазоне 400-500 нм) позволяет оценить антиоксидантную способность водорослей в условиях стресса окружающей среды, поскольку каротиноиды играют важную роль в защите от окислительного стресса (Zivcak et al., 2014).

Изменения в спектрах поглощения также могут быть использованы для изучения воздействия других загрязнителей, таких как органические вещества и накопление питательных элементов. Спектры поглощения водорослей очень чувствительны к изменениям окружающей среды, поэтому они являются важным инструментом для оценки состояния здоровья и уровня загрязнения водоемов (Govindjee & Papageorgiou, 2004). Многократное измерение спектров поглощения позволяет отслеживать долгосрочное влияние накопления загрязнителей на фотосинтез водорослей и предоставляет данные для принятия мер по охране окружающей среды.

2.3.1.2. Основные принципы спектров флуоресценции и их экологическое значение

Спектры флуоресценции — это еще один широко используемый спектральный метод в экологических исследованиях. Он оценивает состояние здоровья фотосинтезирующих организмов путем измерения способности

биологических образцов повторно испускать фотоны после их поглощения. Когда молекулы хлорофилла *a* поглощают фотоны, они переходят на более высокий энергетический уровень и затем испускают избыточную энергию в виде флуоресценции. Интенсивность и спектральные характеристики флуоресценции (например, положение максимума флуоресценции) могут предоставить детальную информацию о состоянии фотосинтетической системы и эффективности переноса электронов (Stirbet & Govindjee, 2012).

Изменения в флуоресценции хлорофилла *a* могут использоваться для оценки целостности и функциональности фотосинтетических мембран. Когда растения подвергаются воздействию тяжелых металлов (таких как Cu^{2+} и Ag^{+}) или других факторов окружающей среды, параметры флуоресценции хлорофилла (например, F_v/F_m , ФСII) могут значительно изменяться. F_v/F_m представляет собой максимальную фотохимическую эффективность ФСII, снижение которой обычно указывает на повреждение реакционного центра ФСII (Wang et al, 2017). Кроме того, анализ гашения флуоресценции (например, NPQ, неконкурентное гашение) позволяет выявить механизмы защиты фотосистемы от световых повреждений путем рассеяния избыточной энергии.

В экологическом мониторинге спектры флуоресценции также могут использоваться для раннего обнаружения изменений в составе и структуре сообществ водорослей. Различные виды водорослей имеют различный состав фотосинтетических пигментов, что отражается в их характеристиках флуоресценции. Например, цианобактерии характеризуются флуоресценцией фикоцианина и фикоэритрина, в то время как зеленые водоросли в основном излучают флуоресценцию хлорофиллов *a* и *b* (Govindjee & Papageorgiou, 2004). С помощью различных методов анализа флуоресценции можно отслеживать изменения структуры сообществ водорослей и их реакции на стрессовые факторы окружающей среды, что является важным для управления качеством воды и оценки экологических рисков.

2.3.1.3. Комплексный анализ с использованием спектров поглощения и флуоресценции

Для более полной оценки воздействия загрязнителей окружающей среды на фотосинтезирующие организмы исследователи часто используют комбинацию спектров поглощения и флуоресценции. Спектры поглощения предоставляют информацию о количестве и типах фотосинтетических пигментов, в то время как спектры флуоресценции раскрывают функциональное состояние фотосинтетической системы и эффективность переноса энергии (Strasser et al., 2004). Одновременное измерение спектров поглощения и флуоресценции позволяет точнее определить комплексное воздействие загрязнителей окружающей среды на фотосинтез.

Например, при исследовании токсического действия Cu^{2+} и Ag^+ на зеленые водоросли спектры поглощения показывают снижение содержания хлорофилла, а спектры флуоресценции — уменьшение отношения F_v/F_m и увеличение значения NPQ. Эти изменения указывают на то, что тяжелые металлы не только непосредственно влияют на синтез и стабильность фотосинтетических пигментов, но и, вызывая окислительный стресс, дополнительно повреждают структуру фотосистем (Kalaji et al., 2017). Этот комбинированный метод анализа предоставляет информацию на разных уровнях, что помогает глубже понять механизмы токсичности тяжелых металлов.

Кроме того, комбинация анализа спектров поглощения и флуоресценции позволяет различать различные типы экологических стрессов. Спектральный анализ может помочь отличить влияние загрязнения тяжелыми металлами, эвтрофикации из-за накопления питательных веществ и теплового стресса, поскольку эти стрессовые факторы различным образом воздействуют на фотосинтетические пигменты и фотосистемы (Govindjee & Papageorgiou, 2004). Таким образом, комплексный анализ спектров поглощения и флуоресценции обеспечивает более полное представление для экологических и токсикологических исследований.

В целом спектральные методы поглощения и флуоресценции играют ключевую роль в экологических исследованиях. Они предоставляют детальную информацию о состоянии здоровья фотосинтезирующих организмов и их адаптационных способностях, являясь важными инструментами для оценки воздействия загрязнений окружающей среды и экологических рисков. В будущих исследованиях эти спектральные методы продолжают играть важную роль в мониторинге качества воды, оценке экологических рисков и разработке стратегий охраны окружающей среды.

2.3.2. Флуоресценция хлорофилла как показатель состояния фотосинтетических мембран фотосинтезирующих организмов. Механизмы генерации флуоресценции хлорофилла

Флуоресценция хлорофилла — это важное спектральное явление, широко используемое для оценки фотосинтетической активности и состояния фотосистем фотосинтезирующих организмов. Измерение флуоресценции хлорофилла позволяет получить важную информацию о функциональном состоянии фотосистемы II (ФСII) и фотосистемы I (ФСI), а также оценить целостность фотосинтетических мембран и эффективность переноса электронов (Маторин, Рубин, 2012). В условиях загрязнения тяжелыми металлами или при других стрессовых воздействиях окружающей среды флуоресценция хлорофилла является идеальным инструментом для мониторинга состояния растений и оценки уровня загрязнения окружающей среды (Antal, Rubin, 2008).

2.3.2.1. Основные принципы флуоресценции хлорофилла

Когда фотосинтезирующий организм поглощает световую энергию, молекулы хлорофилла возбуждаются на более высокий энергетический уровень. В идеальных условиях большая часть поглощенной энергии используется для фотохимических реакций (т.е. квантового выхода фотохимии в фотосинтезе), а небольшая часть теряется в виде излучения (т.е. флуоресценции) или тепла. Флуоресценция хлорофилла *a* возникает в процессе фотосинтеза и главным образом исходит из антенн и реакционных

центров ФСII. Когда реакционные центры ФСII повреждены или электронно-транспортная цепь нарушена, интенсивность флуоресценции обычно увеличивается, поскольку поглощенная энергия не может эффективно использоваться и переизлучается в виде флуоресценции (Govindjee & Papageorgiou, 2004).

Генерация флуоресценции хлорофилла может быть понята через процесс поглощения света в ходе фотосинтеза. Световая энергия сначала захватывается молекулами хлорофилла, находящимися в антеннах фотосистемы, и затем передается в реакционный центр. Если передача энергии проходит гладко, световая энергия используется для расщепления воды на кислород, протоны и электроны. Однако в условиях стрессов окружающей среды или загрязнения, например, при воздействии тяжелых металлов, передача энергии может быть нарушена, что приводит к увеличению флуоресценции (Stirbet & Govindjee, 2012).

2.3.2.2. Фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла

Интенсивность сигнала флуоресценции хлорофилла регулируется множеством факторов, среди которых основными являются фотохимическое тушение и нефотохимическое тушение. Фотохимическое тушение (qP) относится к процессу, при котором фотосистема II (ФСII) использует поглощенную световую энергию для фотохимических реакций, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции. Нефотохимическое тушение (NPQ) — это механизм, с помощью которого фотосистема защищает себя от светового повреждения, рассеивая избыточную световую энергию, что также приводит к снижению интенсивности флуоресценции (Müller et al., 2001). Увеличение NPQ обычно указывает на воздействие стрессовых факторов окружающей среды или окислительного стресса на фотосинтетическую мембрану, например, при высокой освещенности, температурном стрессе или загрязнении тяжелыми металлами.

Когда реакционные центры ФСII находятся в "открытом" состоянии, они

эффективно используют световую энергию для фотохимических реакций, и интенсивность флуоресценции минимальна. В "закрытом" или насыщенном состоянии, когда световая энергия не может быть эффективно использована для фотохимических реакций, интенсивность флуоресценции достигает максимума. Измерение этих изменений в флуоресценции позволяет оценить фотохимическую эффективность ФСII и состояние фотосинтеза (Govindjee & Papageorgiou, 2004).

2.3.2.3. Спектральные характеристики флуоресценции хлорофилла и адаптивность к окружающей среде

Спектральные характеристики флуоресценции хлорофилла могут отражать адаптивные способности растений к изменениям в окружающей среде. В идеальных условиях максимальная фотохимическая эффективность ФСII (F_v/F_m) обычно находится в диапазоне от 0,78 до 0,85, что является стандартным значением для здоровых растений. Когда растения подвергаются воздействию стрессов окружающей среды (например, загрязнению тяжелыми металлами, засухе, солевому стрессу или высокой температуре), значение F_v/F_m обычно снижается, что указывает на повреждение фотосинтетических мембран и снижение фотохимической эффективности (Strasser et al., 2004). Это изменение служит чувствительным индикатором для мониторинга состояния здоровья растений.

Кроме того, увеличение значения нефотохимического тушения (NPQ) является защитным механизмом растений против светового повреждения. Увеличивая пути теплового рассеивания, растения способны уменьшать фотодинамическое повреждение при высоком освещении. Этот защитный механизм особенно важен при воздействии тяжелых металлов (например, Cu^{2+} и Ag^+), которые вызывают окислительный стресс, приводящий к деградации белка D1 и повреждению функции ФСII (Тодоренко и др. 2014).

2.3.2.4. Применение флуоресценции хлорофилла и ее экологическое значение

Метод регистрации флуоресценции хлорофилла имеет важное значение в

экологических исследованиях и мониторинге окружающей среды. Во-первых, параметры флуоресценции могут быть использованы для ранней диагностики физиологического состояния растений и оценки токсического воздействия загрязнителей (Гольцев и др., 2016). Например, когда водные растения подвергаются воздействию загрязнения тяжелыми металлами, значительные изменения в параметрах флуоресценции (таких как F_v/F_m и NPQ) могут быть использованы для обнаружения начальной стадии загрязнения, предоставляя своевременную информацию для борьбы с загрязнением и восстановления окружающей среды (Kalaji et al., 2017).

Во-вторых, измерение флуоресценции хлорофилла позволяет различать различные источники экологического стресса. Например, механизмы воздействия загрязнения тяжелыми металлами и дефицита питательных веществ (таких как азот и фосфор) на флуоресценцию хлорофилла различны: первые обычно снижают значение F_v/F_m за счет прямого влияния на функцию ФСII, тогда как вторые могут ослаблять электронно-транспортную цепь фотосистемы (Stirbet et al., 2020). Анализ изменений спектра флуоресценции может выявить механизмы адаптации растений к различным стрессовым факторам окружающей среды, что позволяет оптимизировать стратегии экологического мониторинга.

Наконец, технология флуоресценции хлорофилла также имеет важное значение для изучения роста и адаптивности растений. Путем мониторинга изменений параметров флуоресценции можно оценить фотосинтетическую адаптивность растений в различных условиях окружающей среды, таких как изменения освещенности, колебания температуры или стресс от дефицита питательных веществ. Измерения флуоресценции также могут выявить внутривидовое и межвидовое разнообразие фотосинтетических реакций, что предоставляет данные для исследований адаптивности и эволюции растений в экологическом контексте (Govindjee & Papageorgiou, 2004).

2.3.3. Быстрая флуоресценция хлорофилла *a*

Быстрая флуоресценция хлорофилла *a* (OJIP-тест) представляет собой

важный спектральный метод для исследования динамики фотохимических процессов фотосинтеза. Кривая ОЛР состоит из нескольких характерных точек (О, J, I, Р) индукционной кривой флуоресценции хлорофилла а, и измерение этих точек позволяет анализировать структуру и функциональное состояние фотосинтетических мембран.

2.3.3.1. Основные принципы кривой ОЛР

Кривая индукции быстрой флуоресценции хлорофилла а (кривая ОЛР) представляет собой динамическое отражение быстрого фотохимического отклика растений при переходе от темновых к световым условиям. Точка О обозначает начальную флуоресценцию (F_o), когда все реакционные центры ФСII полностью открыты; точки J и I представляют собой два переходных этапа накопления акцепторов электронов в цепи переноса электронов от Q_A к Q_B и далее; точка Р обозначает максимальную флуоресценцию (F_m), соответствующую полному закрытию всех реакционных центров ФСII (Strasser et al., 2004).

Кривая ОЛР предоставляет важную информацию о коэффициенте переноса электронов ФСII и состоянии здоровья фотосистемы. В нормальных условиях кривая ОЛР демонстрирует типичное четырехфазное (О-J-I-Р) повышение, отражающее процесс переноса электронов от воды к $NADP^+$. Однако, когда растения подвергаются стрессовым воздействиям окружающей среды (например, загрязнению тяжелыми металлами или световому стрессу), форма кривой ОЛР может значительно изменяться. Например, увеличение амплитуды в точках J и I указывает на накопление электронов в цепи переноса, тогда как снижение точки Р отражает уменьшение максимальной фотохимической эффективности ФСII (Zivcak et al., 2014).

2.3.3.2. Применение быстрой флуоресценции хлорофилла а в экологических исследованиях

2.3.3.2.1. Оценка реакции растений на стрессовые факторы окружающей среды

Быстрая флуоресценция хлорофилла а (ОЛР-тест) широко используется

для оценки реакции растений на различные стрессовые воздействия окружающей среды, такие как загрязнение тяжелыми металлами, засуха, солевой стресс и высокая температура (Ciscato et al., 1999). При воздействии тяжелых металлов, таких как Cu^{2+} и Ag^+ , форма кривой ОЖР изменяется, что проявляется в увеличении амплитуды точек J и I и снижении точки P. Эти изменения отражают блокировку электронно-транспортной цепи и повреждение реакционных центров ФСII, что приводит к снижению фотосинтетической эффективности (Kalaji et al., 2017).

2.3.3.2.2. Анализ изменений структуры и функции фотосинтетических мембран

ОЖР-тест также может выявить изменения структуры и функции фотосинтетических мембран при различных условиях окружающей среды. Например, при световом стрессе деградация белка D1 и закрытие реакционных центров ФСII приводят к увеличению F_0 и снижению F_m на кривой ОЖР (Lazar, 1999). Эти изменения могут использоваться для мониторинга фотодинамических повреждений и восстановительных процессов растений, что способствует исследованию механизмов регуляции фотосинтеза (Kate Maxwell, Giles N. Johnson, 2000).

2.3.3.2.3. Дифференциация различных источников загрязнения

Кривая ОЖР может использоваться для дифференциации различных типов экологических загрязнений (Mallick, N., & Mohn, F. N., 2003). Например, изменения кривой ОЖР, вызванные загрязнением тяжелыми металлами, обычно проявляются в увеличении точек J и I, тогда как органические загрязнители или температурный стресс могут вызывать другие модели изменений кривой (Strasser et al., 2004). Такой анализ помогает идентифицировать источники загрязнения и оценивать экологические риски.

2.3.4. Метод комбинационного рассеяния света. Основные физические принципы и механизмы

Рамановская спектроскопия, основанная на неупругом рассеянии света, широко применяется для анализа биологических объектов, включая

молекулы, клетки, ткани и организмы, как живые, так и фиксированные (Rygula et al., 2013; Pacia et al., 2015; Vlasov et al., 2020; Baranska et al., 2014). Метод позволяет определять качественный и количественный состав биомолекул, таких как липиды и пигменты, а также их конформации (Pirutin et al., 2023). Среди преимуществ - неинвазивность, возможность измерений *in situ* и *in vivo*, а также накопленный опыт интерпретации спектров (Allakhverdiev et al., 2022; Wei et al., 2015).

Рамановская спектроскопия использует электромагнитное излучение, характеризующееся длиной волны (λ , см или нм) и частотой (ν , Гц), связанными уравнением: $\nu = c/\lambda$, где c — скорость света (3×10^{10} см/с) [Hof et al., 2014; Pirutin et al., 2023]. Энергия излучения квантована, и энергия кванта рассчитывается как: $E = h \cdot \nu = h \cdot c/\lambda$, где h — постоянная Планка (6.6×10^{-34} Дж·с) (Allakhverdiev et al., 2022). Волновое число ($\bar{\nu} = 1/\lambda$, см $^{-1}$) отражает количество волн на 1 см и применяется для анализа вибрационных переходов в диапазоне 100–40,000 см $^{-1}$ (Wei et al., 2015).

Химические связи в молекуле подвержены различного рода колебаниям — изменениям длины или углов между связями. Эти колебания вносят свой вклад в общую энергию молекулы. Поскольку энергия молекулы квантуется, молекула характеризуется определенным набором энергетических подуровней, которые могут быть вычислены в соответствии с правилами квантовой механики с использованием уравнения: $E = (n + 1/2) \cdot h \cdot \nu$, где n — квантовое число (Hof et al., 2014; Pirutin et al., 2023). Принцип отбора допускает переходы на соседний уровень ($\Delta E = h\nu$), но обертоновые полосы ($2h\nu$, $3h\nu$) с меньшей интенсивностью также наблюдаются (Pirutin et al., 2023) (2.3.1).

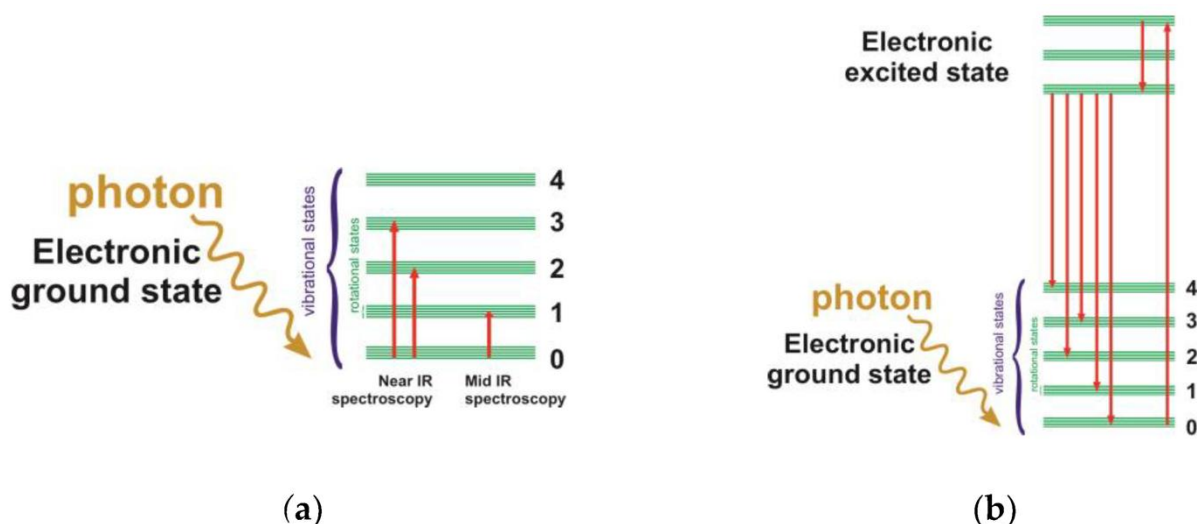


Рис.2.3.1. Энергетические переходы, типичные для измерений с помощью инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света: (а) поглощение в ИК-диапазоне (энергетические переходы, соответствующие обертону или основному переходу, показаны для спектроскопии ближнего и среднего ИК-диапазона соответственно); (б) фотолюминесценция, которая часто возникает при исследовании биологических объектов с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света (Pirutin et al., 2023).

Рамановские спектры возникают при неупругом рассеянии видимого или ультрафиолетового света, изменяющего вибрационное состояние молекулы (Allakhverdiev et al., 2022). Интенсивность спектральных полос зависит от изменения поляризуемости молекулы в электромагнитном поле (Langer et al., 2020). Характеристические частоты, связанные с функциональными группами, позволяют идентифицировать биомолекулы с точностью до ~5% (Rygula et al., 2013; Pacia et al., 2015).

Колебательная спектроскопия - это раздел молекулярной спектроскопии, который изучает спектры поглощения и отражения, возникающие при квантовых переходах между энергетическими уровнями колебаний молекул

[Pirutin et al., 2023]. Диапазон частот колебательных переходов, выраженный в волновых числах, колеблется от 100 до $\sim 40\,000\text{ см}^{-1}$ (вблизи ультрафиолетового, видимого и ИК-диапазонов). Колебательные спектры соединений возникают либо в результате прямого поглощения инфракрасного излучения, преобразованного затем для изменения колебательного состояния молекул (ИК-спектроскопия), либо во время неупругого взаимодействия видимого и/или ультрафиолетового излучения с молекулой, когда часть световой энергии поглощается или испускается молекулой, которая приводит к изменению колебательного состояния молекул (рамановская спектроскопия) (Born & Bradburn, 1947).

Во время этого процесса интенсивность полосы частот спектров комбинационного рассеяния определяется величиной изменений поляризуемости молекул (способности соединений приобретать электрический или магнитный дипольный момент во внешнем электромагнитном поле), когда эта молекула колеблется на данной частоте. Интенсивность линии в спектре зависит от способности возбуждать колебания молекул светом соответствующей частоты, а также от способности излучения изменять дипольный момент молекулы. Способность изменять дипольный момент и поляризуемость могут быть по-разному выражены для разных функциональных групп, и, следовательно, их характерные полосы в ИК- и рамановском спектрах будут характеризоваться разной интенсивностью (Landsberg & Mandelstam, 1928; Pirutin et al., 2023).

Используя колебательные спектры, можно оценить наличие и конформацию определенных групп в молекуле. Кроме того, колебательные спектры могут быть использованы для оценки кристаллических структур, наличие и строение которых влияют на энергию колебательных переходов и, следовательно, на колебательный спектр [Pirutin et al., 2023]. Интенсивность спектра позволяет судить о количестве молекул данного типа в образце и/или о количестве связей определенного типа [Pirutin et al., 2023]. Рассеяние можно рассматривать как очень быстрый процесс поглощения и испускания

фотонов. Поглощая световой фотон, молекула переходит в нестабильное возбужденное электронное состояние, из которого она испускает фотон (рис. 2.3.1) (Prado et al., 2014). В случае рэлеевского рассеяния молекула поглощает фотон на нулевом колебательном уровне и возвращается на тот же уровень после излучения (изменения энергии не происходит). В случае стоксова рассеяния молекула поглощает фотон на нулевом колебательном уровне, а затем испускает только часть энергии поглощенного фотона, переходя таким образом на первый колебательный уровень с одновременным уменьшением частоты рассеянного света (Pirutin et al., 2023). В случае антистоксова рассеяния молекула поглощает фотон, находящийся на возбужденном (ненулевом) колебательном уровне, а после излучения теряет часть своей энергии и переходит на нулевой колебательный уровень с одновременным увеличением частоты рассеянного света (волнового числа) (Pirutin et al., 2023).

Интенсивность линий комбинационного рассеяния света чрезвычайно низка; она значительно меньше интенсивности линий, возникающих как в результате процессов рэлеевского рассеяния, так и поглощения света (Swierczewska et al., 2012). Когда молекула поглощает фотон и переходит в возбужденное электронное, она излучает фотон и переходит в основное состояние. Этот процесс называется фотолюминесценцией (Prado et al., 2014); в зависимости от конфигурации возбужденного электронного состояния оно делится на флуоресцентное и фосфоресцирующее (Prado et al., 2014; Pirutin et al., 2023).

Спектральный диапазон приборов комбинационного рассеяния света в основном определяется используемым источником света; в зависимости от длины волны исследуемый диапазон может варьироваться от 250 до 4000 см^{-1} (ультрафиолетовый, видимый, ближний и средний ИК-диапазоны) (Pirutin et al., 2023; Fang & Wu., 2007).

На практике существует большая вероятность получения резонансного спектра комбинационного рассеяния соединения (если оно теоретически имеет спектр комбинационного рассеяния), если выбрана длина волны,

близкая к максимуму спектра поглощения этого соединения. Среди часто встречающихся биологических соединений, дающих такую возможность, можно упомянуть различные каротиноиды или полиены, хромофоры, геммы, хлорофиллы и т.д.

2.3.5. Особенности использования спектроскопии комбинационного рассеяния в экобиофизических исследованиях

Для экологических измерений также актуально то, что в последнее время активно используются портативные рамановские спектрометры, которые, хотя и не обладают такими хорошими характеристиками, как стационарные спектрометры, но очень мобильны (Sablinskas., 2014).

Одним из наиболее перспективных способов использования рамановской спектроскопии для изучения биологических объектов является количественная и качественная оценка каротиноидов (Pirutin et al., 2023).

Каротиноиды играют очень важную роль в большинстве прокариотических и эукариотических микроорганизмов (Jaeger et al., 2016; Samek et al., 2010). Являясь антиоксидантами, они защищают организмы от повреждений, вызываемых ультрафиолетовым и другими видами излучения, и способствуют репарации поврежденных клеток; в случае растений каротиноиды также являются компонентами фотосистемы (Frank et al., 1999; Krinsky et al., 2004). Каротиноиды - это распространенные природные пигменты, которые обычно имеют красновато-желтый цвет и нерастворимы в воде (Pirutin et al., 2023). Благодаря своей антиоксидантной активности они широко используются в биофизических исследованиях, а также медицине и пищевой промышленности; некоторые из них являются предшественниками витамина А (Krinsky et al., 2004).

В случае источника света с диапазоном излучения 460-540 нм они демонстрируют очень интенсивный резонансный сигнал с максимумом около 470 нм (или 515 нм для ликопина) (Darvin., 2022). Спектры комбинационного рассеяния каротиноидов обычно очень похожи друг на друга и характеризуются тремя четко различающимися линиями: ν_1 ($\sim 1530 \text{ см}^{-1}$),

интенсивность и положение которых определяются режимами растяжения сопряженных C=C связей; ν_2 ($\sim 1120-1200 \text{ см}^{-1}$), интенсивность и положение которых определяются сочетанием режимов растяжения связей C=C и C–C с режимами изгиба C–H; и ν_3 ($\sim 1000 \text{ см}^{-1}$), интенсивность и положение которых определяются режимами растяжения связей между основной цепью и боковые метильные атомы углерода (Frank et al., 1999; Krinsky et al., 2004; Pirutin et al., 2023). В некоторых случаях также принимается во внимание линия ν_4 ($\sim 950 \text{ см}^{-1}$), связанная с внеплоскостными C–H модами. Основываясь на этих трех основных полосах и оценивая положения (расстояния между пиками) и интенсивность (площадь) их пиков, можно оценить ряд требуемых параметров (Jehlička et al., 2014(1)).

Присутствие микроорганизмов в исследуемом образце может быть обнаружено по наличию каротиноидов в спектре комбинационного рассеяния образца; например, наличие каротиноидов может быть использовано для выявления экстремофилов (Osterrothová et al., 2019; Jehlička et al., 2014(1)).

Каротиноиды в микроводорослях делятся на первичные и вторичные (Osterrothová et al., 2019). Первичные каротиноиды (такие как β -каротин, лютеин и ликопин) участвуют в процессах фотосинтеза, в то время как вторичные (например, астаксантин) синтезируются в различных стрессовых условиях и обычно накапливаются в липидных каплях, которые позволяют отслеживать развитие стресса (Kaczor & Baranska., 2011). Таким образом, даже качественная регистрация увеличения содержания каротиноидов и/или их перераспределения в отдельной клетке может свидетельствовать о развитии стресса.

Различные каротиноиды характеризуются незначительно отличающимися максимумами линий и соотношениями их амплитуд. Например, максимум полосы ν_1 для астаксантина и неоксантина слегка смещен в длинноволновую область, в то время как соответствующий максимум ликопина и бактериоруберина смещен в коротковолновую область (Jehlička et al., 2014(2)). Оригинальный метод определения содержания

ликопина в каротиноидной смеси был предложен в работе (Darvin et al., 2005(2)). Спектр поглощения ликопина характеризуется дополнительным максимумом на длине волны 514,5 нм, что позволяет оценить наличие и содержание этого соединения с помощью лазера, излучающего на соответствующей длине волны. На основе сдвига полосы ν_1 , зарегистрированного методом рамановской спектроскопии, был предложен метод измерения уровня гидратации арктических лишайников (Mishra et al., 2019; Mishra et al., 2020). Этот параметр важен, поскольку гидратация активирует процессы фотосинтеза в лишайниках.

Основываясь на пиковых соотношениях ν_1/ν_2 , ν_1/ν_3 и ν_2/ν_3 , а также на других методах, было показано, что изменения pH в клетках водорослей не вызывают изменений в содержании хлорофилла *a* и *b* (Shutova et al., 2016), в то время как содержание и конформация каротиноидов, по-видимому, изменяются. Исследования, направленные на оценку влияния инсектицида тиаметоксама на листья кукурузы, показали, что это соединение вызывает изменения в фотосинтетической активности растений (Todorenko et al., 2021; Todorenko et al., 2020). Основываясь на анализе соотношений ν_1/ν_2 , ν_1/ν_3 и ν_4/ν_3 , авторы пришли к выводу, что этот эффект сопровождается изменением конформации каротиноидов, но не их содержания.

Используя полуколичественную оценку интенсивности пиков в спектрах комбинационного рассеяния света каротиноидов, авторы других исследований определяли степень зрелости арбузов (Dhanani et al., 2022) и крепость (зрелость) острого перца (Legner et al., 2021).

Рамановская спектроскопия может быть использована для неинвазивной оценки общего содержания каротиноидов в образце (клетках). Для этой цели используется площадь (интенсивность) полосы ν_1 (Darvin et al., 2022) (иногда нормализованная к интенсивности других полос (Pilát et al., 2012)).

Таким образом, использование рамановской спектроскопии обеспечивает быстрое, неинвазивное (*in vivo*) определение каротиноидов, а также приблизительную оценку их состава и содержания в отдельных клетках и

клеточных культурах. Однако такая цель требует определенного подхода и набора требований к оборудованию и методике измерения, особенно учитывая тот факт, что сигналы, полученные от живых культур, имеют значительную шумовую составляющую, обусловленную главным образом флуоресценцией. Снижение уровня шума иногда становится нетривиальной задачей, требующей особого подхода как к оборудованию, так и к методам (Wei et al., 2015). Однако настоятельно необходимо обеспечить правильную оценку интенсивности пика, его положения и даже максимумов. Кроме того, в отличие от ВЭЖХ, разница между пиками различных каротиноидов обычно не слишком велика, чтобы существенно затруднить точную идентификацию типов каротиноидов в образце (Osterrothová et al., 2019). С другой стороны, использование рамановской микроскопии позволяет проводить измерения на отдельных клетках, что может быть полезно в случае гетерогенных культур. В целом, такой вывод является достаточно универсальным и может быть применен не только для изучения каротиноидов, но и для изучения других пигментов и соединений методом рамановской спектроскопии.

Биологические пигменты представляют собой большую группу природных пигментированных соединений, вырабатываемых живыми организмами (Jaeger et al., 2016; Samek et al., 2010). Наряду с каротиноидами, в этот класс соединений входят такие группы, как хиноны, флавоноиды (полифенолы), хлорофилл, феофитин, цитохромы, гемоглобин и др (Jaeger et al., 2016; Samek et al., 2010). Рамановская спектроскопия достаточно активно используется для оценки наличия и содержания таких пигментов в различных микроорганизмах (водорослях, бактериях, лишайниках и эндолитах, в том числе обитающих в галитах; обзор приведен в (Jehlička et al., 2014(2))).

Рамановская спектроскопия также использовалась для изучения колоний микроорганизмов на наличие таких пигментов, как флексирубин, имеющий каротиноидоподобную структуру, цитонемин (из цианобактерий), хлорофиллы и т.д. (Jehlička et al., 2014(2); Němečková et al., 2021; Jehlička et al., 2013).

Одна из наиболее актуальных областей применения рамановской спектроскопии (иногда в сочетании с другими методами и подходами) включает идентификацию соединений и оценку их внутриклеточного распределения (картирование), содержания и конформации в водорослях и микроводорослях (Jaeger et al., 2016; Samek et al., 2010). Это позволяет исследователю использовать водоросли в экологических исследованиях; как правило, небольшое количество клеток водорослей отбирается из биореактора или среды их обитания и затем помещается под микроскоп. Работа с отдельными клетками требует довольно большого количества измерений для получения достоверных данных, но в то же время предоставляет некоторые дополнительные возможности (например, вышеупомянутое внутриклеточное картирование соединений); самое главное, это позволяет работать со смешанными культурами, но оценивать только выбранные клетки.

Наиболее распространенные варианты этого типа анализа включают определение локализации различных каротиноидов и других пигментов, а также оценку содержания и локализации соединений, содержащихся в липидных телах (см., например, (Osterrothová et al., 2019; Jehlička et al., 2014; Pilát et al., 2012; Wei et al., 2014; Pořízka et al., 2014; Sharma et al., 2015; Moudříková et al., 2016; Samek et al., 2010)). Некоторые из этих исследований уже упоминались в других разделах данного обзора.

Еще одной важной задачей, которую может решить рамановская микроскопия, является контроль наличия неорганических полифосфатных включений в клетках. Фосфор является одним из важных элементов, необходимых для функционирования клетки. Его доступность ограничена для большинства живых существ на Земле; в то же время запасы этого соединения могут периодически пополняться, что определяет актуальность его внутриклеточного хранения (обычно в виде неорганических полифосфатов). Использование рамановской спектроскопии позволяет оценить количество и расположение неорганических полифосфатных включений (пик 1160 см⁻¹) (Moudříková et al., 2017; Solovchenko et al., 2019).

Азот также важен для функционирования клетки. Известно, что включения кристаллического гуанина ($C_5H_5N_5O$) являются одной из важных форм накопления азота в фитопланктоне. Использование микроскопии комбинационного рассеяния света позволяет оценить содержание и внутриклеточную локализацию гуанина (Mojzeš et al., 2020).

На сегодняшний день также разработан метод одновременной оценки нескольких соединений в клетках водорослей с помощью рамановской микроскопии. Для такой оценки используются следующие спектральные диапазоны: $457\text{--}507\text{ см}^{-1}$ для крахмала (с максимумом около 479 см^{-1}), $2836\text{--}2869\text{ см}^{-1}$ для липидов (максимум при 2854 см^{-1}), $1143\text{--}1190\text{ см}^{-1}$ для полифосфатов (максимум при 1159 см^{-1}), $613\text{--}684\text{ см}^{-1}$ для гуанина (максимум при 651 см^{-1}) и область $2795\text{--}3060\text{ см}^{-1}$ для углеводородных соединений, характеризующихся наличием ковалентных C–H связей (максимум при 2935 см^{-1}) (Moudříková et al., 2021). В этом случае особенно важно снижение автофлуоресценции, которая генерируется фотосинтетическим аппаратом водорослей, и величина которой может превышать регистрируемый сигнал. Более того, при определенных условиях комбинационный сигнал некоторых соединений (например, каротиноидов) способен перекрывать сигналы других веществ. Все эти проблемы требуют некоторых специальных процедур (фотообесцвечивание в особых условиях), позволяющих регистрировать спектры таких веществ, как крахмал, липиды, неорганические полифосфаты и т.д. (Moudříková et al., 2016).

2.4. Токсичность тяжелых металлов

Тяжелые металлы, такие как медь (Cu), серебро (Ag), кадмий (Cd), свинец (Pb) и другие, широко распространены в окружающей среде, и их основные источники включают природные геологические процессы и антропогенную деятельность (например, добычу полезных ископаемых, промышленные выбросы, сельскохозяйственную деятельность и неправильную обработку сточных вод). Эти металлы из-за их устойчивости к разложению и способности к бионакоплению могут вызывать долгосрочную

экологическую токсичность в водных экосистемах, влияя на рост, размножение и выживание водных организмов (Ali et al., 2019).

Источники и распределение тяжелых металлов в окружающей среде

Распределение и поведение тяжелых металлов в водоемах зависят от их химических свойств (таких как растворимость, окислительно-восстановительное состояние, способность к комплексообразованию) и факторов окружающей среды (например, pH, температура, окислительно-восстановительный потенциал, наличие органических веществ). В водной среде тяжелые металлы могут вступать в реакции с твердыми частицами, растворенными органическими веществами и другими химическими соединениями путем осаждения, адсорбции, комплексообразования и окислительно-восстановительных реакций, что влияет на их распределение и форму (Baker et al., 2000).

Водные растения и микроорганизмы являются основными индикаторами загрязнения тяжелыми металлами. Поскольку они непосредственно обитают в водной среде и обмениваются веществами с растворенными веществами, эти организмы подвержены накоплению тяжелых металлов и их токсическому воздействию. Тяжелые металлы могут проникать в биологические организмы путем адсорбции, активного поглощения или пассивной диффузии. Попадая в клетки, эти металлические ионы могут взаимодействовать с различными биомолекулами, вызывая биотоксичность (Ali et al, 2019).

Биологические особенности токсичности тяжелых металлов

Токсическое воздействие тяжелых металлов зависит от вида металлических ионов, их концентрации, времени воздействия, условий окружающей среды (например, pH и температуры), а также от вида и физиологического состояния затронутого организма. Например, медь и серебро являются высокоэффективными антимикробными средствами, поскольку они могут разрушать клеточные мембраны микроорганизмов, нарушать функции белков и вызывать повреждение ДНК (Cervantes &

Gutierrez-Corona, 1994). Однако механизмы токсичности и модели воздействия меди и серебра в окружающей среде значительно различаются, что связано с их химическим поведением и биодоступностью в водной среде.

Токсичность тяжелых металлов обычно влияет на водные организмы через несколько основных механизмов:

1. Окислительный стресс: многие тяжелые металлы (например, медь и серебро) могут катализировать окислительно-восстановительные реакции в организме, вызывая образование большого количества активных форм кислорода (АФК). Эти АФК могут повреждать клеточные мембраны, белки, ДНК и другие биомолекулы, приводя к дисфункции клеток и даже их гибели (Stohs & Bagchi, 1995).

2. Нарушение метаболизма: ионы тяжелых металлов могут связываться с различными ферментами и метаболитами внутри клетки, ингибируя ключевые метаболические процессы (например, фотосинтез, дыхание). Например, ионы меди могут связываться с хлорофиллом, разрушая его способность к поглощению света и напрямую влияя на эффективность фотосинтеза (Sunda & Huntsman, 1998).

3. Повреждение мембран: некоторые тяжелые металлы, такие как серебро и кадмий, могут напрямую внедряться в клеточную мембрану, изменяя ее проницаемость и нарушая целостность и функции мембраны, что приводит к утечке внутриклеточного содержимого (Lemire et al, 2013).

4. Генотоксичность: тяжелые металлы, такие как свинец и ртуть, могут вызывать разрывы, кросслинкинг и мутации в ДНК, что приводит к генетическим повреждениям и повышенному риску канцерогенеза (Silbergeld et al., 2000).

В целом, токсические эффекты тяжелых металлов являются многогранными и сложными, их тяжесть и диапазон воздействия регулируются множеством внутренних и внешних факторов. Таким образом, оценка токсичности тяжелых металлов в водной среде требует учета совместного действия различных факторов окружающей среды и биологических факторов.

2.4.1. Токсичность тяжелых металлов для водных фотосинтезирующих микроорганизмов

Водные фотосинтезирующие микроорганизмы (такие как зеленые водоросли и цианобактерии) являются важной частью водных экосистем. Они не только являются первичными продуцентами, обеспечивающими органическими веществами и кислородом другие организмы в экосистеме, но и играют ключевую роль в циклах углерода, азота и фосфора в водоемах. Однако было показано, что загрязнение тяжелыми металлами оказывает значительное токсическое воздействие на эти микробные сообщества, что угрожает здоровью и стабильности всей водной экосистемы.

Влияние тяжелых металлов на фотосинтез

Фотосинтез является основным метаболическим процессом фотосинтезирующих микроорганизмов, от которого напрямую зависят их рост и размножение. Ионы тяжелых металлов (такие как Cu^{2+} и Ag^+) оказывают значительное ингибирующее действие на фотосинтез, что выражается в следующих аспектах:

1. **Ингибирование фотосистемы II (ФСII):** ФСII является наиболее чувствительной к воздействию тяжелых металлов частью фотосинтетического аппарата. Исследования показывают, что Cu^{2+} и Ag^+ могут связываться с ключевыми белками ФСII (белком D1), вызывая повреждение реакционного центра, блокировку электронно-транспортной цепи и, как следствие, снижение фотохимической эффективности и эффективности преобразования энергии (Lichtenthaler et al., 2005). В условиях загрязнения серебром фотосистема II у цианобактерий показывает значительное снижение фотохимического тушения (qP) и увеличение нефотохимического тушения (NPQ), что указывает на блокировку электронного транспорта и усиление диссипации световой энергии из-за присутствия серебра (Stirbet & Govindjee, 2012).

2. **Разрушение хлорофиллов и каротиноидов:** хлорофиллы и каротиноиды являются основными пигментами, ответственными за

поглощение света и передачу энергии в процессе фотосинтеза. Ионы тяжелых металлов могут вызывать деградацию хлорофилла и окисление каротиноидов, снижая таким образом эффективность фотосинтеза. Cu^{2+} может образовывать комплексы с тетрапиррольной структурой хлорофилла, приводя к его разложению и потере функции (Kalaji et al., 2017).

3. Окислительный стресс и накопление АФК: как уже упоминалось, тяжелые металлы (Cu^{2+} и Ag^+) могут вызывать образование АФК через реакции типа Фентона. Эти АФК могут непосредственно атаковать компоненты фотосистемы, особенно реакционные центры ФСII, что приводит к усилению окислительного повреждения. В исследованиях было показано, что при воздействии Cu^{2+} в клетках зеленых водорослей значительно повышается уровень супероксидного аниона (O_2^-) и пероксида водорода (H_2O_2), что свидетельствует о сильном окислительном стрессе, вызванном тяжелыми металлами (Goltsev et al., 2009; Goltsev et al., 2003).

Влияние тяжелых металлов на клеточные структуры и функции

Кроме непосредственного ингибирования фотосинтеза, тяжелые металлы также могут влиять на другие клеточные функции и структуры водных фотосинтезирующих микроорганизмов:

1. Повреждение мембран: ионы тяжелых металлов, такие как Cu^{2+} и Ag^+ , могут связываться с фосфолипидами и белками клеточной мембраны, изменяя ее текучесть и проницаемость, что приводит к разрушению мембраны и утечке внутриклеточного содержимого. Такие повреждения мембраны также могут влиять на ионный баланс, поглощение питательных веществ и выведение продуктов метаболизма (Valko et al., 2005).

2. Нарушение функций белков: ионы тяжелых металлов могут связываться с тиольными группами ($-\text{SH}$) в молекулах белков, нарушая их третичную структуру и функциональную активность. Например, ионы Cu^{2+} могут ингибировать активность ключевых ферментов, таких как нитратредуктаза и супероксиддисмутаза, что влияет на азотный метаболизм и антиоксидантную защиту водорослей (Pinto et al., 2003).

3. **Повреждение ДНК и РНК:** такие тяжелые металлы, как серебро и медь, могут вызывать окислительные повреждения, разрывы и мутации в ДНК и РНК, что нарушает экспрессию генов и синтез белков. У клеток зеленых водорослей, подвергшихся воздействию Cu^{2+} , наблюдалось увеличение разрывов ДНК и хромосомных аномалий, что свидетельствует о генотоксическом эффекте тяжелых металлов (Mosa et al, 2016).

Различия в чувствительности к тяжелым металлам среди фотосинтезирующих микроорганизмов

Различные виды фотосинтезирующих микроорганизмов демонстрируют значительные различия в чувствительности к тяжелым металлам, что связано с их клеточной структурой, метаболическими путями и антиоксидантной системой. Например, зеленые водоросли обычно более чувствительны к токсичности Cu^{2+} , чем цианобактерии, что может быть связано с более высокой активностью антиоксидантных ферментов и более эффективными механизмами образования хелаторов у цианобактерий (Sinha & Häder, 2008). Кроме того, такие условия окружающей среды, как pH воды, температура и питание, могут существенно влиять на биодоступность и токсичность тяжелых металлов, что приводит к различным реакциям микроорганизмов на воздействие тяжелых металлов.

Таким образом, токсичность тяжелых металлов для водных фотосинтезирующих микроорганизмов проявляется во многих аспектах, включая ингибирование фотосинтеза, повреждение клеточных мембран, повреждение белков и нуклеиновых кислот. Эти токсические эффекты могут привести к снижению роста и жизнеспособности фотосинтезирующих микроорганизмов, что в свою очередь влияет на первичную продуктивность и экологическое равновесие водных экосистем. В следующем разделе мы рассмотрим механизмы токсичности конкретных тяжелых металлов, таких как серебро и медь, чтобы лучше понять их поведение и воздействие в водной среде.

2.4.2. Механизмы токсичности серебра

Серебро (Ag) как тяжелый металл широко используется в промышленности, медицине и потребительских товарах, таких как текстиль, покрытия, упаковка пищевых продуктов и медицинское оборудование, благодаря своим превосходным антибактериальным свойствам. Однако с увеличением использования наноматериалов серебра и ионов серебра все большее беспокойство вызывает их потенциальная токсичность для окружающей среды, особенно для водных экосистем. Экологическая токсичность серебра главным образом обусловлена ионами серебра (Ag^+), которые могут взаимодействовать с биомолекулами, вызывая повреждение клеток и метаболические нарушения. В этом разделе рассматриваются механизмы токсичности серебра, с акцентом на то, как ионы серебра оказывают токсическое воздействие на водные фотосинтезирующие микроорганизмы.

Механизмы поглощения и накопления ионов серебра

Ионы серебра в водной среде в основном существуют в растворенном виде и могут поглощаться водными фотосинтезирующими микроорганизмами, такими как зеленые водоросли и цианобактерии. Механизм поглощения ионов серебра обычно осуществляется через пассивную диффузию или активный транспорт, в зависимости от концентрации ионов серебра, условий окружающей среды (таких как pH и температура) и вида микроорганизмов. При низких концентрациях ионы серебра преимущественно проникают в клетки через ионные каналы путем пассивной диффузии, тогда как при высоких концентрациях они могут активно транспортироваться через мембранные белки (Lemire et al, 2013).

После попадания в клетку ионы серебра быстро взаимодействуют с различными биомолекулами, такими как белки, липиды и нуклеиновые кислоты, что приводит к изменениям их структуры и функции. Ионы серебра склонны связываться с белками и ферментами, содержащими тиоловые группы, нарушая их каталитическую активность и структурную целостность. Например, исследования показали, что ионы серебра могут связываться с

белками на клеточной мембране, изменяя ее структуру и проницаемость, что вызывает нарушение обмена веществ между клеткой и окружающей средой (Kawata et al., 2009).

Повреждение клеточной мембраны под воздействием серебра

Токсическое действие серебра в первую очередь проявляется в повреждении клеточной мембраны. Ионы серебра могут взаимодействовать с фосфолипидами и белками клеточной мембраны, изменяя их структуру и функцию. В частности, ионы серебра могут реагировать с тиоловыми группами (-SH) в мембранных белках, разрушая дисульфидные связи белков и, следовательно, приводя к потере их функции. Такое разрушительное действие значительно изменяет текучесть и проницаемость клеточной мембраны, что в конечном итоге приводит к повреждению ее структуры и утечке внутриклеточного содержимого (Morones et al., 2005).

Кроме того, ионы серебра могут вызывать дополнительное повреждение клеточной мембраны путем генерации активных форм кислорода (АФК). Наличие ионов серебра может индуцировать окислительно-восстановительные реакции, приводящие к образованию супероксид-анионов (O_2^-), перекиси водорода (H_2O_2) и гидроксильных радикалов ($\bullet OH$). Эти АФК могут напрямую атаковать цепи жирных кислот в липидном бислое, вызывая перекисное окисление липидов мембраны, что приводит к дальнейшему повреждению ее структуры (Kędziora et al., 2018). Генерация АФК под воздействием ионов серебра также может нарушать электрохимический градиент мембраны, нарушая энергетический метаболизм клетки и процессы сигнальной передачи.

Влияние серебра на клеточный метаболизм

Токсическое воздействие ионов серебра не ограничивается повреждением клеточной мембраны; они могут также нарушать внутриклеточные метаболические процессы различными путями. Во-первых, ионы серебра могут связываться с ключевыми ферментами в клетке и ингибировать их активность. Например, ионы серебра могут связываться с

тиоловыми группами таких ферментов, как нитратредуктаза, нитритредуктаза и супероксиддисмутаза, ингибируя их нормальную функцию и тем самым нарушая азотный метаболизм и антиоксидантную защиту (Lansdown, 2010).

Во-вторых, ионы серебра оказывают ингибирующее действие на синтез белков. Исследования показали, что ионы серебра могут связываться с белками и РНК в рибосомах, нарушая их структуру и функции, подавляя процесс трансляции мРНК и приводя к блокировке синтеза белков (Lok et al., 2007). Такое ингибирующее действие не только влияет на нормальный рост и размножение клеток, но также может приводить к дефициту важных функциональных белков, вызывая множество метаболических нарушений.

Кроме того, ионы серебра могут нарушать энергетический метаболизм клеток. Они могут ингибировать функции митохондрий, влияя на активность ключевых ферментных комплексов в электронно-транспортной цепи и снижая синтез АТФ (Navarro et al., 2008). Например, ионы серебра могут связываться с коферментом Q на митохондриальной мембране, нарушая процесс переноса электронов, что приводит к блокировке электронно-транспортной цепи и снижению синтеза АТФ. Эти нарушения энергетического метаболизма дополнительно ослабляют антиоксидантные способности клетки, усиливая окислительный стресс, вызванный ионами серебра.

Окислительный стресс, вызванный серебром

Окислительный стресс является важным механизмом токсического действия серебра. Ионы серебра могут вызывать окислительный стресс различными путями, приводя к чрезмерному накоплению АФК в клетке. После проникновения в клетку ионы серебра могут катализировать реакции Фентона или подобные окислительно-восстановительные реакции, приводя к образованию большого количества АФК. Эти АФК атакуют различные биомолекулы в клетке, включая липиды, белки и ДНК, вызывая молекулярные повреждения и функциональные нарушения (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

1. **Перекисное окисление липидов:** АФК могут вызывать перекисное окисление мембранных липидов, особенно в клеточных мембранах, богатых ненасыщенными жирными кислотами. Перекисное окисление липидов не только разрушает целостность и функции клеточной мембраны, но и приводит к образованию ряда вредных метаболитов, таких как малоновый диальдегид (MDA), которые могут дополнительно способствовать развитию окислительного стресса (Huang et al., 2014).

2. **Окисление белков:** АФК, вызванные ионами серебра, могут вызывать окислительное повреждение белков, включая карбонилирование, окисление тиолов и разрушение дисульфидных связей. Эти окислительные повреждения приводят к потере нормальной конформации и функции белков, что в свою очередь влияет на различные метаболические пути клетки (Holt & Bard, 2005).

3. **Повреждение ДНК:** АФК также могут атаковать молекулы ДНК, вызывая различные повреждения, такие как окисление оснований, разрывы одно- и двуцепочечных нитей, сшивки ДНК-белок и другие. Эти повреждения могут приводить к генетическим мутациям, хромосомным aberrациям и апоптозу, что значительно влияет на пролиферацию и выживаемость клеток (Choudhury & Das, 2012).

Влияние серебра на фотосинтетическую систему

Фотосинтетическая система, особенно фотосистема II (ФСII), является еще одной важной мишенью токсического действия серебра. Исследования показывают, что ионы серебра могут нарушать структуру и функции ФСII, влияя на нормальную работу электронно-транспортной цепи и тем самым снижая эффективность фотосинтеза (Stoyanova et al., 2007). Ионы серебра могут связываться с белками D1 в ФСII, нарушая их структурную целостность и блокируя перенос электронов. Кроме того, ионы серебра могут вызывать деградацию пигментов в ФСII (например, хлорофилла), снижая эффективность захвата и преобразования световой энергии (Goltsev et al., 2009; Goltsev et al., 2003).

Влияние ионов серебра на фотосинтетическую систему также проявляется в изменении параметров флуоресценции хлорофилла. У зеленых водорослей и цианобактерий, подвергшихся воздействию серебра, наблюдается значительное снижение максимальной квантовой эффективности (F_v/F_m), что указывает на ингибирование фотохимической активности фотосистемы II. Одновременно снижается и фактическая квантовая продуктивность (Y_{II}), что свидетельствует о блокировке переноса электронов и снижении фотохимической активности (Stirbet & Govindjee, 2012).

Повреждение ДНК и генотоксичность, вызванные серебром

Токсическое действие серебра также проявляется в прямом повреждении ДНК и генотоксичности. Ионы серебра могут напрямую взаимодействовать с молекулами ДНК или вызывать повреждения ДНК косвенно, через генерацию АФК. Ионы серебра могут взаимодействовать с фосфатными группами или основаниями в ДНК, вызывая нестабильность структуры и разрывы. Кроме того, АФК, индуцированные ионами серебра, могут вызывать повреждения ДНК, такие как окисление оснований, разрывы цепей и сшивки, которые могут приводить к мутациям, хромосомным aberrациям и апоптозу (Ahamed et al., 2010).

Исследования показывают, что клетки, подвергшиеся воздействию наночастиц серебра или ионов серебра, демонстрируют значительные повреждения ДНК, включая одно- и двуцепочечные разрывы, увеличение количества сшивок ДНК-белок и снижение способности к репарации ДНК. Эти генотоксические эффекты могут дополнительно приводить к остановке клеточного цикла, апоптозу или некрозу, что существенно влияет на пролиферацию и выживаемость клеток (Kim et al., 2009).

Комплексное действие многогранных токсических эффектов серебра

Токсический механизм серебра многогранен и включает повреждение клеточных мембран, нарушение метаболизма, окислительный стресс, ингибирование фотосинтеза и генотоксичность. Эти токсические эффекты

часто взаимосвязаны, формируя сложное комплексное действие. Окислительный стресс, вызванный серебром, может не только напрямую повреждать клеточные мембраны, белки и ДНК, но и усиливать его токсические эффекты, нарушая антиоксидантную защиту клетки. Одновременно ингибирование фотосинтетической системы под воздействием серебра может влиять на энергетический метаболизм и антиоксидантные способности клетки, что делает комплексное токсическое действие серебра еще более серьезным (Lansdown, 2010).

В заключение, ионы серебра оказывают токсическое действие на водные фотосинтезирующие микроорганизмы различными путями, включая повреждение клеточных мембран, нарушение метаболизма, окислительный стресс, ингибирование фотосинтеза и повреждение ДНК. Эти механизмы взаимодействуют между собой, формируя комплексное токсическое действие серебра, что угрожает здоровью и стабильности водных экосистем. Глубокое понимание механизмов токсичности серебра способствует разработке эффективных мер по защите окружающей среды и контролю загрязнения, снижая его вред для водных организмов и экосистем. В следующем разделе будут рассмотрены механизмы токсичности меди с целью дальнейшего анализа их поведения и воздействия в водной среде.

2.4.3. Механизмы токсичности меди

Медь (Cu) как важный переходный металл является необходимым микроэлементом для многих организмов, участвуя в ряде ключевых физиологических и биохимических процессов, таких как фотосинтез, дыхание, антиоксидантная защита и каталитическая функция ферментов. Однако, когда концентрация меди превышает допустимые для организма пределы, она проявляет выраженные токсические эффекты. Медь является распространенным загрязнителем в водных средах, источниками которого могут быть горнодобывающая промышленность, сточные воды, пестициды и очистные сооружения (Sunda & Huntsman, 1998). В этом разделе рассматриваются механизмы токсичности меди, в частности, как ионы меди

(Cu^{2+}) оказывают токсическое воздействие на водные фотосинтезирующие микроорганизмы посредством различных биохимических путей.

Механизмы поглощения и накопления ионов меди

Поглощение и накопление ионов меди — это первый шаг к проявлению их токсичности для водных организмов. Водные фотосинтезирующие микроорганизмы, такие как зеленые водоросли и цианобактерии, способны поглощать ионы меди (Cu^{2+}) через механизмы пассивной диффузии и активного транспорта. Эффективность поглощения ионов меди зависит от факторов окружающей среды (таких как pH, температура, интенсивность света) и особенностей самих микроорганизмов (состава клеточной стенки, структуры мембраны и наличия и активности транспортных белков) (Fernandes & Henriques, 1991). После попадания в клетку ионы меди взаимодействуют с различными биомолекулами (такими как белки, ферменты, липиды и нуклеиновые кислоты), нарушая нормальные физиологические функции клетки.

При низких концентрациях медь служит кофактором для многих металлопротеинов (медь-цинк-содержащей супероксиддисмутазы, Cu/Zn-SOD), участвуя в окислительно-восстановительных реакциях и антиоксидантной защите. Однако при высоких концентрациях ионы меди связываются с активными группами, такими как тиолы (-SH) и аминогруппы ($-\text{NH}_2$), что приводит к инаktivации ферментов, изменению конформации белков и повышению проницаемости мембран (Stohs & Bagchi, 1995). Эти изменения вызывают серию физиологических стрессовых реакций, включая окислительный стресс, повреждение клеточных мембран, ингибирование фотосинтеза и генотоксичность.

Влияние меди на клеточные мембраны

Токсическое действие меди в первую очередь проявляется в повреждении клеточных мембран. Ионы меди могут нарушать целостность клеточных мембран путем прямого связывания или окисления фосфолипидов и белков. Исследования показывают, что Cu^{2+} может взаимодействовать с

фосфатными группами и цепями ненасыщенных жирных кислот в молекулах мембранных фосфолипидов, вызывая перекисное окисление липидов и нестабильность мембранной структуры (Lemire et al, 2013). Перекисное окисление липидов приводит к образованию вредных метаболитов, таких как малоновый диальдегид (MDA) и гидроксильные радикалы ($\bullet\text{OH}$), которые могут вызывать дальнейшее повреждение клеточных мембран.

Кроме того, ионы меди могут реагировать с тиоловыми группами в мембранных белках, нарушая их структуру и функцию. Cu^{2+} может связываться с транспортными белками на мембране, препятствуя нормальному транспорту питательных веществ и ионов, что нарушает процесс питания клетки и удаление отходов (Valko et al., 2005). Эти разрушительные воздействия увеличивают проницаемость клеточных мембран, приводят к потере электрохимического градиента и дисбалансу ионов внутри и снаружи клетки, что в конечном итоге вызывает утечку внутриклеточного содержимого и гибель клетки.

Ингибирование фотосинтеза медью

Фотосинтез является основным метаболическим процессом водных фотосинтезирующих микроорганизмов, и ингибирование фотосинтеза медью является одним из ключевых проявлений ее токсичности. Ионы меди (Cu^{2+}) обладают высокой аффинностью к фотосистеме II (ФСII), способны связываться с белком D1 в ФСII, что приводит к повреждению реакционного центра и разрыву цепи электронного транспорта (Lichtenthaler et al., 2005).

1. **Влияние на ФСII:** ФСII является наиболее чувствительным к воздействию ионов меди компонентом фотосинтетического аппарата. Исследования показывают, что Cu^{2+} может замещать ионы металлов (магния) в ФСII, нарушая ее структуру и функции. Ионы меди могут связываться с белком D1, вызывая повреждение реакционного центра ФСII и снижение фотохимической эффективности (Kalaji et al., 2017). Кроме того, ионы меди могут вызывать окислительное повреждение ФСII путем генерации АФК, что

дополнительно снижает эффективность переноса электронов и квантовый выход фотохимических реакций (Stirbet & Govindjee, 2012).

2. **Влияние на ФСІ:** хотя ФСІ менее чувствительна к ионам меди, при высоких концентрациях Cu^{2+} может повредить и ФСІ. Исследования показали, что ионы меди могут вызывать деградацию железо-серных кластеров в ФСІ путем генерации АФК и связывания с ядром комплекса ФСІ, что влияет на стабильность цепи электронного транспорта (Strasser et al., 2004). Это приводит к снижению фотохимической активности ФСІ и общей эффективности фотосинтеза.

3. **Влияние на хлорофилл и каротиноиды:** ионы меди могут нарушать процессы синтеза и деградации хлорофилла, изменяя содержание фотосинтетических пигментов. Cu^{2+} может образовывать комплексы с тетрапиррольной структурой хлорофилла, вызывая его разложение и снижение способности к захвату света (Goltsev et al., 2009; Goltsev et al., 2003). Одновременно ионы меди могут вызывать окисление каротиноидов, нарушая передачу и распределение световой энергии в фотосистемах.

Окислительный стресс, вызванный медью

Одним из основных механизмов токсичности меди является индукция окислительного стресса. Cu^{2+} , как сильный окислитель, может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, вызывая генерацию АФК (например, супероксид-анионов, перекиси водорода и гидроксильных радикалов). Эти АФК могут взаимодействовать с различными биомолекулами в клетке, вызывая перекисное окисление липидов, окисление белков и повреждение ДНК (Stohs & Bagchi, 1995).

1. **Перекисное окисление липидов:** АФК, индуцированные медью, могут взаимодействовать с ненасыщенными жирными кислотами в мембранных липидах, вызывая их перекисное окисление и разрушение структуры клеточных мембран. Продукты перекисного окисления липидов (такие как MDA) не только повреждают клеточные мембраны, но и могут

служить вторичными сигнальными молекулами, дополнительно индуцируя апоптоз и некроз (Valko et al., 2005).

2. **Окисление белков:** Cu^{2+} может генерировать сильные окислительные гидроксильные радикалы через реакции Фентона или цикл Хабера-Вейса, которые могут взаимодействовать с остатками аминокислот в белках, вызывая их окислительное повреждение и денатурацию. Например, Cu^{2+} может окислять антиоксидантные ферменты (такие как супероксиддисмутаза и каталаза), снижая антиоксидантную способность клетки и делая ее более восприимчивой к окислительному стрессу (Lushchak, 2011).

3. **Повреждение ДНК:** АФК, индуцированные медью, также могут атаковать молекулы ДНК, вызывая различные формы повреждений, такие как окисление оснований, разрывы одноцепочечных и двуцепочечных нитей, сшивки ДНК-белок и другие. Эти повреждения ДНК могут приводить к генетическим мутациям, хромосомным aberrациям и апоптозу, что значительно влияет на пролиферацию и выживаемость клеток (Valko et al., 2006).

Повреждение нуклеиновых кислот и белков медью

Токсичность меди проявляется не только в воздействии на мембраны и фотосинтез, но также в прямом повреждении нуклеиновых кислот и белков в клетке. Cu^{2+} может вызывать окислительное повреждение и структурные разрушения ДНК и РНК путем генерации АФК или прямого связывания. Исследования показывают, что клетки зеленых водорослей, подвергшиеся воздействию высокой концентрации ионов меди, демонстрируют значительные разрывы одноцепочечных и двуцепочечных нитей ДНК, что свидетельствует о выраженном генотоксическом эффекте меди (Pinto et al., 2003).

Кроме того, ионы меди могут связываться с тиоловыми группами и другими активными группами в белках, изменяя их структуру и функцию. Например, ионы меди могут связываться с белками в рибосомах, нарушая

структурную стабильность рибосом и их функцию синтеза белков, что приводит к ингибированию процесса трансляции (Lichtenthaler et al., 2005). Такое ингибирование синтеза белков дополнительно нарушает нормальный метаболизм и физиологические функции клетки, приводя к снижению роста и выживаемости клеток.

Комплексное действие многогранных токсических эффектов меди

Токсический механизм меди многогранен и включает повреждение мембран, нарушение метаболизма, окислительный стресс, ингибирование фотосинтеза и генотоксичность. Эти токсические эффекты часто взаимосвязаны, формируя сложное комплексное воздействие. Например, окислительный стресс, вызванный медью, не только напрямую повреждает мембраны, белки и ДНК, но и усиливает метаболические нарушения и функциональные расстройства клетки за счет ослабления антиоксидантной системы защиты. Одновременно ингибирование фотосинтеза медью может повлиять на энергетический метаболизм клетки, делая ее более уязвимой к окислительному повреждению (Lushchak, 2011).

Кроме того, токсичность меди регулируется факторами окружающей среды (такими как pH, температура, условия освещения и состояние питания). Например, в кислых условиях биодоступность меди увеличивается, что усиливает ее токсическое воздействие (Lemire et al., 2013). В условиях высокой освещенности генерация АФК, индуцированных медью, значительно увеличивается, что усугубляет повреждение фотосистем и окислительный стресс (Lichtenthaler et al., 2005).

Таким образом, ионы меди оказывают токсическое воздействие на водные фотосинтезирующие микроорганизмы различными путями, включая повреждение клеточных мембран, нарушение метаболизма, окислительный стресс, ингибирование фотосинтеза и повреждение нуклеиновых кислот. Эти механизмы взаимодействуют между собой, формируя комплексное токсическое воздействие меди, что угрожает здоровью и стабильности водных экосистем. Глубокое понимание механизмов токсичности меди

способствует разработке эффективных мер по защите окружающей среды и контролю загрязнения, снижая ее вред для водных организмов и экосистем. В следующем разделе мы рассмотрим механизмы резистентности и толерантности водорослей к токсичности тяжелых металлов, чтобы лучше понять, как водные организмы противостоят вызовам загрязнения тяжелыми металлами.

2.4.4. Механизмы резистентности и толерантности водорослей к тяжелым металлам

Загрязнение тяжелыми металлами представляет серьезную угрозу для водных экосистем, особенно для фотосинтезирующих организмов, таких как водоросли. Водоросли, являясь первичными продуцентами в водных экосистемах, играют ключевую роль в круговороте веществ и потоке энергии. Противодействуя токсическому воздействию тяжелых металлов (например, меди и серебра), водоросли развили ряд сложных механизмов резистентности и толерантности, позволяющих поддерживать их рост и выживание. Эти механизмы включают внеклеточное исключение, внутриклеточную изоляцию, хелатирование металлов, антиоксидантную защиту, репарацию ДНК и метаболическую регуляцию (Lemire et al, 2013). В этом разделе подробно рассматривается, как водоросли используют эти механизмы для защиты от токсичности тяжелых металлов.

Внеклеточное исключение и барьер клеточной стенки

Первой линией защиты водорослей является ограничение поступления ионов тяжелых металлов путем внеклеточного исключения и барьера клеточной стенки. Многие водоросли могут секретировать определенные вещества, такие как полисахариды, слизь и белки-экспортеры, которые связываются с ионами тяжелых металлов во внешней среде, уменьшая их поглощение. Например, некоторые зеленые водоросли могут секретировать внеклеточные полисахариды, которые адсорбируют Cu^{2+} и Ag^+ в воде, образуя нерастворимые комплексы, предотвращая их проникновение в клетку (Zhou et al., 2016).

Кроме того, структура клеточной стенки водорослей играет важную роль в защите от ионов тяжелых металлов. Клеточная стенка водорослей в основном состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина и белков, среди которых некоторые компоненты, такие как пектины, содержат большое количество карбоксильных и гидроксильных групп, способных к хелатированию ионов тяжелых металлов и их фиксации на поверхности стенки, снижая их биодоступность (Byamba et al., 2022). Такая барьерная функция клеточной стенки эффективно ограничивает проникновение ионов тяжелых металлов и снижает их прямое токсическое воздействие на клетки.

Внутриклеточные механизмы изоляции

Когда ионы тяжелых металлов проникают внутрь клетки, водоросли изолируют их в определенных органеллах или областях для снижения их вредного воздействия на клеточные функции. Основными путями внутриклеточной изоляции являются накопление ионов тяжелых металлов в вакуолях и металлических гранулах. Мембраны этих органелл или гранул обладают высокой устойчивостью к металлам, что предотвращает утечку ионов тяжелых металлов в цитоплазму, защищая другие части клетки от повреждений (Mishra et al., 2006).

Вакуоли являются важным местом для изоляции ионов тяжелых металлов в клетках водорослей. Исследования показывают, что у зеленых и синих водорослей, подвергшихся воздействию высоких концентраций тяжелых металлов, увеличивается объем и количество вакуолей для хранения избытка ионов тяжелых металлов. Например, при обработке Cu^{2+} у зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* наблюдается выраженная вакуолизация, причем концентрация меди в вакуолях значительно выше, чем в цитоплазме, что подчеркивает важную роль вакуолей в изоляции тяжелых металлов (Byamba et al., 2022).

Механизмы хелатирования металлов

Хелатирование металлов является одним из ключевых механизмов водорослей для защиты от токсичности тяжелых металлов. Водоросли могут

синтезировать и накапливать определенные хелатирующие агенты (такие как фитохелатины, глутатион, металлотионеины и др.), которые связываются с ионами тяжелых металлов внутри клетки, образуя нетоксичные или малотоксичные хелатные комплексы. Эти комплексы могут быть дополнительно изолированы в органеллах (например, в вакуолях) или выведены из клетки с помощью механизмов экстррузии (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

1. **Фитохелатины (Phytochelatins, PCs):** фитохелатины представляют собой короткие пептиды, образованные путем полимеризации глутатиона и считаются основными хелатирующими агентами в водорослях. PCs обладают тиольными группами, которые связываются с ионами тяжелых металлов (например, Cu^{2+} и Ag^+), образуя стабильные хелатные комплексы, что снижает концентрацию свободных ионов металлов и их токсичность (Yadav, 2010). Кроме того, комплексы PCs с тяжелыми металлами обычно изолируются в вакуолях, что дополнительно снижает их концентрацию и токсичность в цитоплазме.

2. **Глутатион (Glutathione, GSH):** глутатион представляет собой трипептид, обладающий сильной антиоксидантной активностью и способностью к хелатированию металлов. GSH может напрямую связываться с ионами тяжелых металлов, образуя стабильные комплексы, и также участвует в синтезе фитохелатинов как их предшественник. Исследования показывают, что в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами, уровень GSH в клетках водорослей значительно увеличивается, что подчеркивает его важную роль в защите от токсичности тяжелых металлов (Singh et al., 2006).

3. **Металлотионеины (Metallothioneins, MTs):** металлотионеины представляют собой другую группу белков, связывающих тяжелые металлы, которые богаты остатками цистеина и способны образовывать стабильные комплексы с различными ионами тяжелых металлов (например, Cu^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+}). Экспрессия металлотионеинов в водорослях обычно значительно

увеличивается при воздействии тяжелых металлов, что подчеркивает их важность в устойчивости к металлам (Hassinen et al., 2011).

Антиоксидантная система защиты

Антиоксидантная система защиты является одним из основных механизмов водорослей для борьбы с окислительным стрессом, вызванным тяжелыми металлами. Тяжелые металлы (например, Cu^{2+} и Ag^+) могут вызывать окислительный стресс, приводя к образованию АФК, что вызывает перекисное окисление липидов, окисление белков и повреждение ДНК. Водоросли уменьшают накопление АФК и связанные с ними повреждения за счет усиления антиоксидантной системы защиты (Foyer & Noctor, 2011).

1. **Антиоксидантные ферменты:** в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами, водоросли обычно увеличивают активность нескольких антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и аскорбатпероксидаза (APX). SOD превращает супероксид-анионы (O_2^-) в перекись водорода (H_2O_2), в то время как CAT и APX разлагают H_2O_2 на воду и кислород, уменьшая накопление АФК и связанные с ними повреждения (Mittler, 2002).

2. **Неферментные антиоксиданты:** помимо антиоксидантных ферментов, водоросли также увеличивают содержание неферментных антиоксидантов (таких как глутатион, флавоноиды, аскорбат) для борьбы с окислительным стрессом, вызванным тяжелыми металлами. Например, исследования показывают, что при воздействии меди и серебра уровень глутатиона и аскорбата в зеленых и синих водорослях значительно увеличивается, что помогает нейтрализовать АФК и уменьшить окислительное повреждение (Sharma et al., 2012).

Механизмы репарации ДНК

Ионы тяжелых металлов (например, Cu^{2+} и Ag^+) могут вызывать повреждения ДНК путем прямого связывания с молекулами ДНК или косвенно через генерацию АФК, что приводит к окислению оснований, разрывам цепей и сшивкам. Водоросли активируют ряд механизмов

репарации ДНК, таких как восстановление поврежденных оснований (BER), нуклеотидная эксцизионная репарация (NER) и негомologичное соединение концов (NHEJ), чтобы устранить такие повреждения и обеспечить стабильность генома (Sancar et al., 2004).

Например, при стрессе, вызванном тяжелыми металлами, некоторые водоросли могут повышать экспрессию генов, связанных с репарацией ДНК, усиливая их способность к восстановлению повреждений. Исследования показывают, что клетки водорослей, подвергшиеся воздействию Cu^{2+} и Ag^+ , проявляют заметное увеличение активности ферментов репарации ДНК, таких как ДНК-полимеразы, лигазы и экзонуклеазы, что подчеркивает важную роль репарации ДНК в устойчивости водорослей к токсичности тяжелых металлов (Gong et al., 2008).

Метаболическая регуляция и экспрессия генов

Водоросли способны адаптироваться к стрессу, вызванному тяжелыми металлами, за счет метаболической регуляции и изменения экспрессии генов. Во-первых, водоросли могут регулировать пути метаболизма, такие как фотосинтез, дыхание и углеродный и азотный обмен, чтобы уменьшить токсическое воздействие тяжелых металлов. Например, в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами, водоросли могут снижать эффективность фотосинтеза, чтобы уменьшить образование АФК, и увеличивать дыхательный обмен, чтобы обеспечить энергию и метаболические промежуточные продукты для синтеза хелатирующих агентов и антиоксидантной защиты (Girotti, 1998).

Кроме того, водоросли могут изменять экспрессию генов для повышения устойчивости к тяжелым металлам. Исследования показывают, что при воздействии тяжелых металлов водоросли обычно активируют экспрессию ряда генов, связанных с защитой, таких как гены, кодирующие антиоксидантные ферменты, белки, связывающие металлы, транспортные белки и ферменты репарации ДНК. Такая регуляция экспрессии генов помогает водорослям быстро адаптироваться к стрессу, вызванному

тяжелыми металлами, и увеличивает их выживаемость (Lemire et al, 2013).

Таким образом, водоросли противостоят токсичности тяжелых металлов с помощью множества механизмов, включая внеклеточное исключение, внутриклеточную изоляцию, хелатирование металлов, антиоксидантную защиту, репарацию ДНК и метаболическую регуляцию. Эти механизмы работают согласованно, позволяя водорослям поддерживать рост и выживание в условиях загрязнения тяжелыми металлами. Глубокое понимание этих механизмов резистентности и толерантности способствует разработке эффективных стратегий управления окружающей средой и восстановления загрязненных экосистем для защиты здоровья, и стабильности водных экосистем. В будущем исследования должны уделять больше внимания молекулярной основе и регуляторным механизмам этих процессов для более эффективного противодействия экологическим вызовам, связанным с загрязнением тяжелыми металлами.

2.5. Влияние различных физико-химических факторов на фотосинтезирующие организмы

Фотосинтезирующие организмы, такие как зеленые водоросли, цианобактерии и другие водные растения, играют важную роль в потоках энергии и круговороте веществ в водных экосистемах. Эти организмы зависят от фотосинтеза для преобразования световой энергии в химическую, что обеспечивает их рост и размножение. Однако различные физико-химические факторы, такие как pH, температура, условия освещения (особенно воздействие ультрафиолетового излучения) и наличие загрязняющих веществ, таких как тяжелые металлы, оказывают значительное влияние на процессы фотосинтеза и состояние фотосинтезирующих организмов. В природной среде эти факторы обычно взаимодействуют друг с другом, и их совокупный эффект определяет физиологическую адаптацию и экологическую динамику фотосинтезирующих организмов. Поэтому глубокое понимание этих факторов и механизмов их воздействия на фотосинтезирующие организмы имеет важное значение для прогнозирования реакции экосистем на изменения окружающей среды.

В данном разделе будет систематически обсуждаться, как ключевые физико-химические факторы влияют на фотосинтезирующие организмы, особенно как эти факторы в различных условиях изменяют эффективность фотосинтеза, структуру и функцию биологических мембран, механизмы антиоксидантной защиты и экспрессию генов, что в конечном итоге влияет на рост, метаболизм и выживаемость фотосинтезирующих организмов.

2.5.1. Влияние pH среды на фотосинтезирующие организмы

pH среды является важным физико-химическим параметром водной среды, который оказывает значительное влияние на рост фотосинтезирующих организмов и эффективность фотосинтеза, непосредственно воздействуя на физиологические функции этих организмов, а также косвенно изменяя доступность питательных веществ и ионов тяжелых металлов в воде. Изменения pH среды могут быть вызваны как естественными процессами (например, вулканической активностью, выветриванием), так и антропогенными факторами (например, кислотными дождями, промышленными выбросами, сельскохозяйственной деятельностью). В условиях кислой или щелочной среды фотосинтезирующие организмы могут испытывать различные типы стресса, что значительно влияет на их фотосинтез, клеточную структуру и физиологические функции (Yu et al., 2022).

Изменение pH напрямую влияет на физиологическое состояние фотосинтезирующих организмов. Например, в кислой среде увеличение концентрации ионов H^+ может привести к изменению протонного градиента клеточных мембран, что, в свою очередь, влияет на процессы синтеза АТФ, приводимые в действие протонным потоком, и другие метаболические активности (Daneshvar et al., 2021). Напротив, в щелочной среде увеличение концентрации ионов OH^- может повлиять на стабильность клеточных мембран и активность мембранных ферментов, что в дальнейшем нарушает процессы фотосинтеза и дыхания. Кроме того, изменение pH может изменять растворимость и форму ионов тяжелых металлов в воде, что, в свою очередь,

влияет на их токсичность. Например, при низких значениях pH растворимость некоторых металлов, таких как алюминий и железо, увеличивается, что делает их более токсичными для фотосинтезирующих организмов (Fernandes & Henriques, 1991).

Влияние pH на фотосистемы

Фотосистема II (ФСII) и фотосистема I (ФСI) являются двумя основными реакционными центрами фотосинтеза, и их функции существенно зависят от pH среды. В кислой среде структура белков D1 и D2 в ФСII может быть повреждена, что влияет на поглощение света и эффективность переноса электронов (Kalaji et al., 2017). Исследования показывают, что при низких значениях pH максимальная фотохимическая эффективность ФСII (F_v/F_m) значительно снижается, что свидетельствует о подавлении фотохимических реакций (Strasser et al., 2004). Кроме того, кислая среда может способствовать фотоповреждению ФСII — необратимому повреждению фотосистемы при высокоинтенсивном свете, которое связано с повышенной концентрацией ионов H^+ .

Напротив, в щелочной среде активность ФСI может быть нарушена. Исследования показывают, что при высоких значениях pH окислительно-восстановительное состояние и стабильность железо-серных кластеров в ФСI нарушаются, что приводит к блокировке потока электронов в цепи переноса электронов (Foyer & Noctor, 2011). Кроме того, щелочные условия могут ингибировать фотохимическую активность ФСI, что дополнительно снижает эффективность фотосинтеза и накопление биомассы.

Влияние pH на фотосинтетические пигменты

Изменение pH среды также влияет на стабильность и функцию фотосинтетических пигментов (таких как хлорофилл и каротиноиды) в фотосинтезирующих организмах. В кислых условиях структура хлорофилла может быть повреждена, что приводит к снижению эффективности поглощения света и ослаблению фотохимических реакций (Goltsev et al., 2009; Goltsev et al., 2003). В частности, кислые условия могут вызвать

деметаллизацию молекул хлорофилла, что приводит к их деградации и снижению эффективности передачи света. Кроме того, кислые условия могут способствовать окислительной деградации каротиноидов, что дополнительно влияет на функцию фотосистем и эффективность фотосинтеза.

В щелочных условиях фотосинтетические пигменты также могут подвергаться неблагоприятным воздействиям. Например, при высоком значении pH может происходить фотодеградация хлорофилла, при которой пигменты в фотосистемах теряют свою фоточувствительность, что снижает эффективность фотосинтеза (Alkhamis et al., 2022). Одновременно щелочная среда может изменять положение и интенсивность пиков поглощения каротиноидов, что влияет на передачу и распределение световой энергии внутри фотосистем. Кроме того, щелочные условия могут изменять взаимодействие между хлорофиллом и белковыми комплексами, что влияет на структуру и функции белковых комплексов в фотосистемах (Goss & Lepetit, 2015).

Влияние pH на клеточные мембраны

Изменение pH значительно влияет на стабильность клеточных мембран фотосинтезирующих организмов. В кислых или щелочных условиях структура липидного бислоя клеточных мембран и функции мембранных белков могут быть нарушены. Например, в кислой среде высокие концентрации ионов H^+ могут взаимодействовать с фосфолипидными молекулами клеточной мембраны, вызывая депротонизацию липидов и повышение текучести, что, в свою очередь, влияет на проницаемость и селективность мембран (López-Maury et al., 2009). Эти изменения могут приводить к дестабилизации структуры и функции мембранных белков, таких как протонные насосы и транспортные белки, что в конечном итоге нарушает энергетический метаболизм клетки и обмен веществ.

В щелочной среде клеточные мембраны также подвергаются воздействию. Исследования показывают, что при высоком pH текучесть клеточных мембран снижается, что может быть связано с взаимодействием

ионов OH^- с белками и липидами мембраны (Pazos et al., 2005). Эти изменения могут влиять на конформацию и функцию мембранных белков, нарушая транспорт ионов через мембрану и процессы клеточной сигнализации. Кроме того, в щелочных условиях липиды мембраны могут подвергаться окислению или гидролизу, что приводит к нестабильности мембранной структуры и нарушению целостности клеток (López-Maury et al., 2009).

Влияние pH на метаболические процессы и активность ферментов

Изменение pH оказывает значительное влияние на метаболические процессы и активность ферментов у фотосинтезирующих организмов. В кислых или щелочных условиях активность некоторых ключевых ферментов (таких как RuBisCO и PEP-карбоксилаза) может быть подавлена, что влияет на эффективность фиксации углерода и фотосинтеза (Sharma et al., 2012). Исследования показывают, что в кислой среде активность RuBisCO значительно снижается, что приводит к уменьшению скорости ассимиляции углерода. Кислая среда также может влиять на поддержание клеточного pH и энергетический метаболизм, что затрудняет поддержание нормальных метаболических функций (Andrews & Lorimer, 1975).

В щелочной среде активность ферментов также может быть подавлена. Например, щелочные условия могут активировать фотодыхательный путь, что снижает эффективность фотосинтеза. Кроме того, щелочная среда может изменять конформацию ферментов и заряд активных центров, ингибируя функцию некоторых ключевых ферментов (Lemire et al., 2013). Такое воздействие не только снижает фиксацию углерода и накопление биомассы, но также влияет на антиоксидантную защиту фотосинтезирующих организмов и их метаболическую адаптацию.

pH является одним из ключевых физико-химических факторов, влияющих на фотосинтезирующие организмы в водной среде. Изменения pH среды могут воздействовать на рост, метаболизм и эффективность фотосинтеза фотосинтезирующих организмов различными путями, включая

прямое воздействие на фотосистемы, стабильность и функцию фотосинтетических пигментов, структуру и проницаемость клеточных мембран, а также изменения в метаболических процессах и активности ферментов. Глубокое понимание механизмов воздействия pH на фотосинтезирующие организмы способствует прогнозированию и управлению состоянием здоровья водных экосистем, а также разработке мер по восстановлению экосистем, подверженных кислотному и щелочному загрязнению. В следующих разделах мы рассмотрим влияние других физико-химических факторов, таких как температура и ультрафиолетовое излучение, на фотосинтезирующие организмы и их совокупные эффекты.

2.5.2. Влияние температуры среды на фотосинтезирующие организмы

Температура является важным физико-химическим фактором, который влияет на рост фотосинтезирующих организмов и эффективность фотосинтеза. Физиологические и метаболические процессы фотосинтезирующих организмов чрезвычайно чувствительны к изменениям температуры, и колебания температуры могут непосредственно воздействовать на несколько этапов фотосинтеза, включая световые реакции и процессы фиксации углерода. Изменение температуры воды может быть вызвано как природными факторами (например, сезонными изменениями, изменениями климата), так и антропогенными факторами (например, промышленными выбросами, изменениями в использовании земель). Понимание механизмов влияния температуры на фотосинтезирующие организмы имеет важное значение для прогнозирования реакции водных экосистем на изменения окружающей среды (Nugun & Benstead, 2019)

Влияние температуры на световые реакции

Температура существенно влияет на процессы световых реакций фотосинтеза. Световые реакции происходят в тилакоидных мембранах хлоропластов, в фотосистеме II (ФСII) и фотосистеме I (ФСI). Изменение температуры может непосредственно повлиять на структуру и функции этих

фотосистем. Исследования показывают, что при низких температурах скорость переноса электронов в ФСII и ФСI значительно снижается, главным образом из-за уменьшения текучести мембран и снижения стабильности белковых комплексов (Berry & Bjorkman, 2003). Низкие температуры также увеличивают дисбаланс окислительно-восстановительного состояния реакционного центра, снижая максимальную фотохимическую эффективность ФСII (F_v/F_m), что влияет на общую эффективность фотосинтеза (Nishiyama et al., 2006).

Напротив, в условиях высокой температуры процессы световых реакций также подавляются. Высокая температура может вызывать фазовые изменения липидов в тилакоидных мембранах, что приводит к дестабилизации структуры мембран и нарушению функций мембранных белков (Yamori et al., 2014). Кроме того, высокая температура может вызвать фотоповреждение фотосистем, особенно белка D1 в ФСII, который легко подвергается деградации под воздействием высоких температур, что приводит к повреждению реакционного центра фотосистемы и снижению фотохимической эффективности (Allakhverdiev et al., 2008). Более того, при высокой температуре может нарушаться электронная транспортная цепь в ФСII и ФСI, что приводит к избыточному образованию активных форм кислорода (АФК) и вызывает окислительный стресс (Murata et al., 2007).

Влияние температуры на процесс фиксации углерода

Температура также оказывает значительное влияние на процесс фиксации углерода у фотосинтезирующих организмов. Фиксация углерода в основном включает ферментативные реакции в путях C3 и C4, и эти реакции имеют различную чувствительность к изменению температуры. Для C3-растений ключевым ферментом фиксации углерода является рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (RuBisCO), активность и стабильность которой значительно зависят от температуры. В условиях низких температур активность RuBisCO снижается, что приводит к снижению эффективности фиксации углерода. Кроме того, низкие температуры могут нарушать

транспорт углерода в хлоропластах СЗ-растений, затрудняя процессы фиксации углерода (Sage & Kubien, 2007).

При высоких температурах у СЗ-растений повышается скорость фотодыхания, что связано с увеличением оксигеназной активности RuBisCO, приводящей к большей степени окислительных, а не карбоксилирующих реакций (Sage & Pearcy, 2000). Это увеличение фотодыхания потребляет фиксированный углерод и снижает чистую фотосинтетическую продуктивность. Кроме того, высокая температура может приводить к инактивации некоторых ключевых ферментов в путях углеродного метаболизма (например, фосфоглицераткиназы, фосфоглицеральдегид-дегидрогеназы), что также снижает эффективность фиксации углерода (Sharkey, 2005).

Для С4-растений, обладающих структурой Кранца и С4-метаболическим путем фиксации углерода, характерна более высокая толерантность к изменению температуры. В условиях низких температур активность фосфоэнолпируваткарбоксилазы (PEPC) в С4-растениях снижается, что уменьшает эффективность первичной фиксации углерода в С4-пути (Sage & Kubien, 2007). Однако, по сравнению с СЗ-растениями, у С4-растений более низкая скорость фотодыхания, поэтому их способность к фиксации углерода обычно выше при высоких температурах (von Caemmerer & Furbank, 2003). Тем не менее, при экстремально высоких температурах метаболизм С4-растений также может подавляться, что связано с повреждением клеточных мембран и нарушением активности ферментов (Sage & Zhu, 2011).

Влияние температуры на стабильность клеточных мембран

Изменение температуры также значительно влияет на стабильность клеточных мембран фотосинтезирующих организмов. В условиях низких температур структура липидного бислоя клеточных мембран становится более жесткой, что снижает текучесть и проницаемость мембран, а также влияет на функции мембранных белков и обмен веществ между клеткой и внешней средой (Los & Murata, 2004). Например, при низких температурах в

фотосинтезирующих организмах изменяется состав липидов плазматической и тилакоидной мембран, что может приводить к блокировке электронного транспорта в цепи переноса электронов и снижению эффективности передачи энергии (Murata & Los, 1997).

В условиях высокой температуры текучесть клеточных мембран увеличивается, что может приводить к фазовому разделению липидов и распаду белковых комплексов (Horváth et al., 2008). Эти изменения ослабляют избирательную проницаемость и стабильность мембран, что влияет на способность клеток адаптироваться к внешней среде. Кроме того, перекисидация липидов, вызванная высокой температурой, может приводить к необратимому повреждению структуры мембран, что дополнительно влияет на выживание и рост фотосинтезирующих организмов (Upchurch, 2008).

Влияние температуры на метаболическую регуляцию и антиоксидантную защиту

Температура также оказывает значительное влияние на метаболическую регуляцию и антиоксидантную защиту фотосинтезирующих организмов. Низкие температуры могут снижать скорость метаболических процессов, включая углеродный, азотный и липидный обмен. В ответ на низкотемпературный стресс фотосинтезирующие организмы могут увеличивать накопление растворимых сахаров и белков в качестве защитных агентов и энергетических резервов (Kaplan et al., 2004). Также низкие температуры могут активировать активность ряда антиоксидантных ферментов (например, супероксиддисмутаза (SOD), каталазы (CAT), аскорбатпероксидазы (APX)), чтобы снизить накопление АФК и связанное с ними окислительное повреждение (Chinnusamy et al., 2007).

В условиях высокой температуры метаболическая активность фотосинтезирующих организмов усиливается, особенно увеличивается скорость дыхания, но это также сопровождается усилением окислительного стресса. В ответ на температурный стресс фотосинтезирующие организмы обычно усиливают антиоксидантную защиту за счет повышения активности

антиоксидантных ферментов (например, SOD, CAT, глутатионпероксидазы (GPX)) и увеличения содержания антиоксидантов (например, глутатиона, аскорбиновой кислоты), чтобы уменьшить избыточное образование АФК и связанное с ними окислительное повреждение (Mittler, 2002).

2.5.3. Влияние ультрафиолетового излучения на фотосинтезирующие организмы. Влияние на фотосинтетическую активность

Ультрафиолетовое (УФ) излучение, особенно ультрафиолетовое излучение типа В (UV-B, 280-320 нм), является частью солнечного излучения, достигающего поверхности Земли, и оказывает значительное воздействие на фотосинтезирующие организмы. Хотя UV-B излучение составляет лишь небольшую часть общего солнечного излучения, его высокая энергия достаточна для того, чтобы вызывать прямое повреждение биомолекул, таких как ДНК, белки и липиды, что, в свою очередь, влияет на несколько этапов фотосинтеза. В связи с разрушением озонового слоя интенсивность UV-B излучения увеличилась, что усилило потенциальную угрозу для фотосинтезирующих организмов (Rozema et al., 2002).

Влияние UV-B излучения на процессы фотосинтеза

UV-B излучение непосредственно влияет на процессы фотосинтеза, включая световые реакции и фиксацию углерода. Во-первых, UV-B излучение повреждает белки D1 и D2 в фотосистеме II (ФСII), что приводит к разрушению реакционного центра и снижению эффективности переноса электронов (Jansen et al., 1998). UV-B излучение также вызывает деградацию хлорофилла, особенно хлорофилла а, что напрямую влияет на эффективность поглощения и преобразования света (Hideg et al., 2013). Кроме того, UV-B излучение вызывает образование АФК, что усиливает фотоповреждения фотосистем и пероксидацию мембранных липидов (Jansen et al., 1998).

UV-B излучение также влияет на процесс фиксации углерода, особенно на активность RuBisCO и эффективность фиксации углерода. Исследования показывают, что у фотосинтезирующих организмов, подвергшихся воздействию UV-B излучения, активность RuBisCO значительно снижается,

что может быть связано с изменением структуры RuBisCO или снижением экспрессии генов под воздействием UV-B (Xue et al, 2005). UV-B излучение также может влиять на стабильность фотосинтетических пигментов и белковых комплексов, снижая эффективность фотосинтеза (Jansen et al., 1998).

Влияние UV-B излучения на клеточные мембраны

UV-B излучение оказывает значительное воздействие на структуру и функции клеточных мембран. UV-B излучение вызывает фотоокислительные реакции липидов мембран, что приводит к снижению стабильности мембран и увеличению их проницаемости (Tevini et al., 1991). Эти окислительные реакции включают пероксидацию липидов и образование свободных радикалов, что приводит к деградации липидов мембран и инактивации мембранных белков, нарушая функции мембран и физиологическое состояние клеток (Zhou et al., 2016).

Влияние UV-B излучения на ДНК

UV-B излучение может вызывать прямые повреждения ДНК, такие как разрывы двойных цепей ДНК, ошибки пар оснований и образование пиримидиновых димеров (Britt, 1996). Эти повреждения ДНК, если они не будут своевременно восстановлены, могут привести к гибели клеток или мутациям, влияя на рост и размножение фотосинтезирующих организмов. Фотосинтезирующие организмы обычно используют несколько механизмов репарации ДНК, таких как нуклеотидная эксцизионная репарация (NER) и фотореактивация, чтобы восстановить повреждения ДНК, вызванные UV-B (Strid et al., 2004). Однако чрезмерное воздействие UV-B излучения может превышать возможности этих репаративных механизмов, приводя к накоплению повреждений ДНК и серьезным нарушениям функций организмов (Jansen et al., 1998).

Влияние UV-B излучения на антиоксидантную защитную систему

UV-B излучение индуцирует образование АФК, вызывая окислительный стресс у фотосинтезирующих организмов. В ответ на окислительный стресс, вызванный UV-B, фотосинтезирующие организмы обычно усиливают свою

антиоксидантную защиту, увеличивая активность антиоксидантных ферментов (например, SOD, CAT, APX) или повышая содержание неферментных антиоксидантов (например, глутатиона, флавоноидов, аскорбиновой кислоты), чтобы нейтрализовать АФК и уменьшить повреждения клеток (Hideg et al., 2013). Тем не менее, при длительном воздействии высокоинтенсивного UV-B излучения антиоксидантная система защиты фотосинтезирующих организмов может не справиться с накоплением АФК, что приводит к окислительному повреждению (Jansen et al., 1998).

Механизмы адаптации и защиты от UV-B излучения

Фотосинтезирующие организмы эволюционировали, чтобы развить различные механизмы адаптации и защиты от воздействия UV-B излучения. Эти механизмы включают синтез ультрафиолетовых абсорбентов (например, флавоноидов и полисахаридов) для поглощения и фильтрации UV-B излучения (Cockell & Knowland, 1999). Кроме того, некоторые водоросли способны регулировать состав фотосинтетических пигментов и мембранных липидов, чтобы уменьшить повреждения UV-B излучением фотосистем и клеточных мембран (Rozema et al., 2002). Также некоторые фотосинтезирующие организмы способны восстанавливать поврежденные ДНК и белки, чтобы минимизировать генетические и метаболические нарушения, вызванные UV-B излучением (Strid et al., 2004).

UV-B излучение является важным экологическим фактором, влияющим на рост фотосинтезирующих организмов и эффективность фотосинтеза. UV-B излучение оказывает многогранное воздействие на физиологическое состояние фотосинтезирующих организмов, включая повреждение фотосистем, подавление процессов фиксации углерода, повреждение клеточных мембран и ДНК, а также активацию антиоксидантных защитных систем. Понимание механизмов воздействия UV-B излучения на фотосинтезирующие организмы имеет важное значение для прогнозирования и управления здоровьем водных экосистем в условиях усиленного ультрафиолетового излучения. Будущие исследования должны продолжать

изучение молекулярных основ и регуляторных механизмов этих процессов, чтобы более эффективно противостоять экологическим вызовам, связанным с глобальными изменениями окружающей среды.

2.5.4. Комплексное воздействие тяжелых металлов и других факторов

В природной среде фотосинтезирующие организмы обычно подвергаются воздействию нескольких стрессовых факторов одновременно, включая загрязнение тяжелыми металлами, изменения температуры, pH, ультрафиолетовое излучение и другие. Токсичность ионов тяжелых металлов (например, ионов меди и серебра) для фотосинтезирующих организмов может усиливаться или ослабляться в различных физико-химических условиях. Исследования показывают, что при совместном воздействии тяжелых металлов и других факторов окружающей среды (таких как температура и ультрафиолетовое излучение) физиологические эффекты на фотосинтезирующие организмы могут быть более сложными и разнообразными (Cheloni & Slaveykova, 2018).

Комплексное воздействие тяжелых металлов и температуры

Изменения температуры — это один из ключевых факторов, влияющих на токсичность тяжелых металлов. При повышенной температуре токсичность тяжелых металлов обычно усиливается, главным образом потому, что при высокой температуре увеличивается текучесть клеточных мембран фотосинтезирующих организмов, что повышает проницаемость клеток для ионов металлов и, следовательно, их поглощение и накопление (Monteiro et al., 2011). Кроме того, высокая температура может вызвать метаболические расстройства в клетке и перегрузку антиоксидантной системы защиты, что усиливает окислительный стресс, вызванный тяжелыми металлами (Mittler, 2002). Например, исследования показывают, что при совместном воздействии высокой температуры и меди фотосистема II (ФСII) у зеленых водорослей подвергается более сильным повреждениям, и максимальная фотохимическая эффективность (F_v/F_m) значительно снижается, что свидетельствует о подавлении световой реакции (Murata et al., 2007).

Наоборот, при низких температурах токсичность тяжелых металлов может ослабляться. Это связано с тем, что при низкой температуре метаболическая активность клеток замедляется, текучесть мембран снижается, что уменьшает скорость поглощения ионов металлов. Кроме того, низкие температуры могут стимулировать антиоксидантную систему защиты фотосинтезирующих организмов, увеличивая активность антиоксидантных ферментов и содержание антиоксидантов, что повышает устойчивость к окислительному стрессу, вызванному тяжелыми металлами (Kaplan et al., 2004). Однако низкие температуры также могут неблагоприятно воздействовать на некоторые фотосинтезирующие организмы, подавляя их скорость роста и эффективность фотосинтеза, что может сделать их более уязвимыми к токсичности тяжелых металлов (Yamori et al., 2014).

Комплексное воздействие тяжелых металлов и изменения pH

pH является еще одним важным фактором окружающей среды, который влияет на химические формы и биодоступность тяжелых металлов. В условиях низкого pH растворимость ионов тяжелых металлов увеличивается, что облегчает их поглощение фотосинтезирующими организмами и повышает их токсичность (Fernandes & Henriques, 1991). Например, в кислых условиях растворимость и реакционная способность ионов меди и серебра усиливаются, что может привести к увеличению их накопления в фотосинтезирующих организмах и, как следствие, к повреждению фотосистем и метаболическим нарушениям (Strasser et al., 2004).

Напротив, при высоком pH некоторые тяжелые металлы (такие как медь и свинец) могут образовывать нерастворимые осадки, уменьшая их биодоступность и токсичность (Daneshvar et al., 2021). Однако щелочная среда также может вызывать другие проблемы, такие как снижение стабильности клеточных мембран и ингибирование активности ферментов, что может усиливать совокупную токсичность тяжелых металлов для фотосинтезирующих организмов (López-Maury et al., 2009). Таким образом, взаимодействие между изменениями pH и тяжелыми металлами имеет

двойственный эффект на токсичность для фотосинтезирующих организмов, который зависит от конкретных условий окружающей среды и видов организмов.

Комплексное воздействие тяжелых металлов и ультрафиолетового излучения

Ультрафиолетовое излучение (особенно UV-B) и тяжелые металлы, действующие совместно, также оказывают значительное воздействие на физиологическое состояние фотосинтезирующих организмов. Само по себе UV-B излучение повреждает фотосистемы, клеточные мембраны и ДНК фотосинтезирующих организмов, а при взаимодействии с тяжелыми металлами (такими как медь и серебро) это повреждение может усиливаться (Jansen et al., 1998). Исследования показывают, что UV-B излучение может усиливать токсичность тяжелых металлов за счет увеличения образования АФК в клетке, что ускоряет индуцированную тяжелыми металлами пероксидацию липидов и деградацию белков (Hideg et al., 2013).

Кроме того, комбинированное воздействие UV-B излучения и тяжелых металлов может вызвать дисбаланс антиоксидантной системы защиты, что делает фотосинтезирующие организмы более уязвимыми к окислительному стрессу и фотоповреждению (Rozema et al., 2002). Например, исследования показали, что у водорослей, подвергшихся воздействию UV-B излучения и ионов меди, наблюдаются более высокие уровни окислительного повреждения и более низкая активность антиоксидантных ферментов, что указывает на синергетический токсический эффект (Tevini et al., 1991).

2.5.5. Синергетическое, антагонистическое и аддитивное действие комбинированных стрессовых факторов

Комплексное воздействие нескольких стрессовых факторов обычно проявляется в виде синергетического, антагонистического или аддитивного эффекта. Синергетический эффект возникает, когда совокупное воздействие нескольких стрессовых факторов больше, чем сумма их отдельных эффектов. Антагонистический эффект имеет место, когда совокупное воздействие

нескольких факторов меньше, чем сумма их отдельных эффектов. Аддитивный эффект — это эффект, при котором совокупное воздействие нескольких факторов равно сумме их отдельных эффектов (Zandalinas et al, 2024).

Синергетическое действие

У фотосинтезирующих организмов синергетические эффекты часто наблюдаются при сочетанном воздействии тяжелых металлов с изменениями температуры, pH или ультрафиолетового излучения. Например, при повышении температуры текучесть клеточных мембран увеличивается, что повышает скорость поглощения ионов тяжелых металлов и усиливает их токсическое действие. Кроме того, высокая температура может усилить окислительный стресс, вызванный тяжелыми металлами, что приводит к более серьезным физиологическим повреждениям (Monteiro et al., 2011). Аналогичным образом, синергетическое действие UV-B излучения и тяжелых металлов может усилить повреждения фотосинтезирующих организмов за счет совместного увеличения продукции АФК и нарушения антиоксидантной системы защиты (Jansen et al., 1998).

Антагонистическое действие

Антагонистические эффекты возникают, когда совокупное воздействие двух или более стрессовых факторов взаимно компенсирует или уменьшает их эффекты. Например, в некоторых случаях низкие температуры могут замедлить поглощение и накопление тяжелых металлов, что снижает их токсичность. Кроме того, при повышении pH некоторые тяжелые металлы, такие как медь, могут образовывать нерастворимые соединения, снижая их биодоступность и токсичность, что может оказывать антагонистическое действие с другими стрессовыми факторами (Fernandes & Henriques, 1991).

Аддитивное действие

Аддитивные эффекты возникают, когда несколько стрессовых факторов действуют независимо и не оказывают значительного взаимодействия друг с другом. Например, изменения температуры и pH могут по отдельности

влиять на фотосинтез и клеточную структуру фотосинтезирующих организмов, и при их одновременном воздействии они могут оказывать влияние на различные физиологические процессы без взаимного усиления или ослабления друг друга (Goltsev et al., 2009; Goltsev et al., 2003).

2.5.6. Известные молекулярные и физиологические изменения и механизмы комбинированного стресса

При воздействии нескольких стрессовых факторов фотосинтезирующие организмы демонстрируют ряд сложных молекулярных и физиологических изменений. Эти изменения включают регуляцию экспрессии генов, активацию антиоксидантной системы защиты, перераспределение метаболических путей и изменения в клеточной структуре (Mittler, 2006).

Регуляция экспрессии генов

Комбинированный стресс обычно вызывает значительные изменения в паттернах экспрессии генов у фотосинтезирующих организмов. При совместном воздействии тяжелых металлов и других стрессовых факторов фотосинтезирующие организмы обычно активируют экспрессию ряда генов, связанных с антиоксидантной защитой, регуляцией метаболизма и репарацией повреждений. Например, при UV-B излучении и стрессе, вызванном тяжелыми металлами, экспрессия генов антиоксидантных ферментов (таких как SOD, CAT, APX) и ферментов репарации (таких как ДНК-полимеразы и нуклеазы) у фотосинтезирующих организмов значительно повышается, чтобы противодействовать окислительным повреждениям и повреждениям ДНК (Hideg et al., 2013).

Кроме того, комбинированный стресс может вызывать изменения в экспрессии генов, связанных с передачей сигнала. Например, при воздействии тяжелых металлов и температурного стресса пути передачи сигнала кальция часто активируются у фотосинтезирующих организмов, что помогает улучшить восприятие и реакцию клеток на изменения окружающей среды (Kaplan et al., 2004). Эти изменения в экспрессии генов отражают сложные механизмы регуляции, которые фотосинтезирующие организмы используют для адаптации к комбинированным стрессовым условиям.

Активация антиоксидантной системы защиты

Активация антиоксидантной системы защиты является одним из ключевых механизмов фотосинтезирующих организмов для противодействия комбинированному стрессу. При воздействии нескольких стрессовых факторов фотосинтезирующие организмы обычно усиливают свою антиоксидантную защиту, повышая активность антиоксидантных ферментов (например, SOD, CAT, GPX) и увеличивая содержание неферментных антиоксидантов (например, глутатиона, аскорбиновой кислоты, флавоноидов) (Mittler, 2002). Эта активация антиоксидантной системы защиты помогает уменьшить накопление АФК и предотвратить окислительное повреждение клеток.

Тем не менее, в условиях комбинированного стресса антиоксидантная система защиты может оказаться перегруженной. Например, при совместном воздействии UV-B излучения и тяжелых металлов антиоксидантная система защиты фотосинтезирующих организмов может оказаться недостаточной для полной нейтрализации избыточного образования АФК, что приводит к повышению уровня АФК в клетке и вызывает окислительное повреждение и апоптоз клеток (Jansen et al., 1998).

Перераспределение метаболических путей

При воздействии комбинированного стресса метаболические пути фотосинтезирующих организмов часто перераспределяются для адаптации к совокупным эффектам нескольких стрессовых факторов. Например, при воздействии высокой температуры и тяжелых металлов фотосинтезирующие организмы могут увеличивать скорость дыхания, чтобы обеспечить больше энергии и метаболических промежуточных продуктов для антиоксидантной защиты и репарации повреждений (Murata et al., 2007). Аналогично, при воздействии кислотного и тяжелого металлического стресса фотосинтезирующие организмы могут регулировать пути углеродного и азотного метаболизма для уменьшения накопления токсичных веществ и окислительного стресса (Daneshvar et al., 2021).

Изменения клеточной структуры

Комбинированный стресс часто приводит к изменениям в клеточной структуре фотосинтезирующих организмов, что повышает их способность адаптироваться к изменениям окружающей среды. Например, при воздействии UV-B излучения и тяжелых металлов может происходить утолщение клеточной стенки для уменьшения проницаемости и поглощения вредных веществ. Кроме того, состав и свойства клеточных мембран также могут изменяться, чтобы повысить их устойчивость и стабильность (Cockell & Knowland, 1999). Эти изменения клеточной структуры помогают повысить выживаемость и адаптационные способности фотосинтезирующих организмов в условиях многократного стресса.

Таким образом, комплексное воздействие тяжелых металлов и других факторов окружающей среды оказывает значительное влияние на физиологическое состояние и экологическую адаптацию фотосинтезирующих организмов. Эти комбинированные стрессовые факторы могут вызывать синергетические, антагонистические или аддитивные эффекты в зависимости от конкретных условий окружающей среды и видов организмов. В ответ на комбинированный стресс фотосинтезирующие организмы демонстрируют сложные молекулярные и физиологические изменения, включая регуляцию экспрессии генов, активацию антиоксидантной системы защиты, перераспределение метаболических путей и изменения клеточной структуры. Глубокое понимание этих изменений и механизмов имеет важное значение для прогнозирования и управления реакцией и адаптационными стратегиями фотосинтезирующих организмов в сложных условиях окружающей среды. Будущие исследования должны продолжить изучение молекулярных основ и механизмов регуляции этих процессов для более эффективного ответа на экологические вызовы, связанные с глобальными изменениями окружающей среды.

2.6. Экологические исследования на модельных системах и организмах

Исследования экосистем часто сталкиваются с проблемами сложности и непредсказуемости. Разнообразие условий окружающей среды и сложность экологических процессов делают прямое изучение целых экосистем чрезвычайно трудным. Для преодоления этих трудностей ученые используют модельные системы и организмы. Эти модели предоставляют упрощенные и контролируемые условия, которые позволяют исследователям манипулировать конкретными переменными и наблюдать их влияние на организмы или экосистемы. В экологических науках модельные системы часто применяются для оценки экологических рисков, прогнозирования изменений в экосистемах и разработки стратегий охраны окружающей среды.

2.6.1. Значение моделирования в экологических исследованиях

Моделирование является ключевым понятием в экологических исследованиях, предоставляя ученым экспериментальную основу для понимания сложных экологических процессов и влияния изменений окружающей среды. В исследованиях экологической токсикологии модельные системы упрощают и контролируют переменные окружающей среды, что позволяет исследователям сосредоточиться на конкретных причинно-следственных связях. Например, при изучении воздействия загрязнения тяжелыми металлами на водные организмы использование модельных систем помогает изолировать конкретные ионы тяжелых металлов, такие как ионы меди (Cu^{2+}) или серебра (Ag^+), и анализировать их экологическую токсичность при различных условиях (Walker et al., 2005).

Применение моделирования в экологических исследованиях имеет множество преимуществ. Во-первых, оно позволяет исследователям контролировать и повторять экспериментальные условия, обеспечивая тем самым надежность и воспроизводимость данных. Например, модельные системы могут использоваться для имитации определенных условий окружающей среды, таких как температура, pH, интенсивность света и концентрация питательных веществ, что позволяет точно контролировать эти переменные и наблюдать их влияние на физиологические и биохимические

реакции организмов (Forbes & Calow, 2002). Таким образом, ученые могут выявлять, как конкретные факторы окружающей среды влияют на рост, эффективность фотосинтеза и выживаемость фотосинтезирующих организмов.

Во-вторых, моделирование позволяет предсказывать будущие изменения в окружающей среде. Вводя в модельные системы прогнозируемые переменные (такие как выбросы парниковых газов, изменения в использовании земель и уровень загрязнения), исследователи могут оценивать, как эти факторы будут влиять на структуру и функции экосистем. Например, модельные системы могут использоваться для прогнозирования потенциального влияния изменения климата на сообщества фотосинтезирующих организмов, таких как воздействие окисления океана на экосистемы коралловых рифов (Hoegh-Guldberg et al., 2007).

Третье преимущество модельных систем заключается в экономии времени и средств. Прямое изучение экосистем в природных условиях требует значительных затрат времени и ресурсов, тогда как использование модельных систем может существенно снизить эти издержки. Кроме того, модельные системы помогают избежать этических проблем и технических ограничений, которые могут возникнуть при проведении исследований в полевых условиях. Например, использование микроводорослей в качестве модельных организмов для оценки экологической токсичности тяжелых металлов не только экономически выгодно, но и обеспечивает большую контролируемость эксперимента и облегчает интерпретацию результатов (Guasch et al., 2003).

Тем не менее, моделирование имеет свои ограничения. Хотя модельные системы могут упрощать сложные экологические процессы, такое упрощение может привести к предвзятости результатов. Например, результаты, полученные в лабораторных условиях, не всегда полностью отражают реакции организмов в природной среде, поскольку условия эксперимента часто не могут воссоздать всю сложность и разнообразие реальной

окружающей среды. Кроме того, численность популяций в модельных системах обычно ограничена и не может адекватно представлять все разнообразие видов и их взаимодействий в экосистеме (Preston, 2002).

В целом, моделирование играет решающую роль в экологических исследованиях. Оно предоставляет ценные инструменты и методы для понимания воздействия изменений в окружающей среде, разработки стратегий управления окружающей средой и прогнозирования будущих изменений в экосистемах. Хотя модельные системы имеют определенные ограничения, они остаются неотъемлемой частью экологических исследований.

2.6.2. Живые модельные системы: Преимущества и ограничения при изучении экологических рисков

Живые модельные системы, т.е. популяции организмов, которые выращиваются и размножаются в контролируемых условиях, являются важным инструментом в экологических исследованиях. Эти системы позволяют изучать влияние загрязнителей или других экологических стрессоров на организмы, используя в контролируемых условиях репрезентативные виды, такие как водоросли, дафнии, рыбы и т.д. (Clements & Rohr, 2009). Живые модельные системы играют ключевую роль в экотоксикологических исследованиях и оценке экологических рисков, особенно при изучении воздействия конкретных химических веществ или загрязнителей на экосистемы.

2.6.2.1. Преимущества живых модельных систем

Во-первых, основным преимуществом живых модельных систем является их высокая степень контролируемости и воспроизводимости. В лабораторных условиях исследователи могут точно контролировать такие переменные окружающей среды, как температура, pH, концентрация питательных веществ и уровень загрязняющих веществ, что повышает надежность результатов исследований. Например, использование зеленых водорослей (таких как *Scenedesmus quadricauda*) в качестве модельных

организмов позволяет тестировать их скорость роста и эффективность фотосинтеза при различных концентрациях тяжелых металлов, что помогает оценить потенциальный риск этих загрязнителей для водных растений (Kalaji et al., 2017).

Во-вторых, живые модельные системы предоставляют информацию о быстром и непосредственном биологическом ответе. Поскольку модельные организмы обычно имеют короткий жизненный цикл и быстро растут, они способны быстро реагировать на изменения в окружающей среде, предоставляя исследователям данные в реальном времени. Например, при исследовании комбинированного воздействия UV-B излучения и загрязнения тяжелыми металлами использование микроводорослей в качестве модельных организмов позволяет в течение нескольких дней наблюдать физиологические и биохимические реакции, такие как образование АФК, изменения активности антиоксидантных ферментов и снижение содержания хлорофилла (Lesser, 2006).

Третье преимущество заключается в том, что живые модельные системы предоставляют возможность раскрыть конкретные механизмы действия экологических стрессоров. Изучая физиологические, генетические и молекулярные реакции модельных организмов в различных условиях окружающей среды, ученые могут глубже понять, как загрязнители влияют на биологические процессы. Например, используя модельное растение *Arabidopsis thaliana*, можно с помощью анализа экспрессии генов и протеомики выявить, как тяжелые металлы воздействуют на метаболические пути в растительных клетках (Barkla et al, 2014).

Кроме того, живые модельные системы широко используются в экологических исследованиях для оценки потенциального риска новых загрязнителей, таких как наночастицы, остатки лекарственных средств и пестициды, которые могут представлять угрозу для окружающей среды и здоровья человека. Используя модельные организмы, исследователи могут быстро проводить скрининг и оценку экологической токсичности и потенциала биоаккумуляции этих новых загрязнителей (Handy et al., 2008).

2.6.2.2. Ограничения живых модельных систем

Несмотря на множество преимуществ, живые модельные системы имеют свои ограничения. Во-первых, результаты исследований в лабораторных условиях могут не полностью отражать реакции организмов в природной среде. Экспериментальные условия в лаборатории обычно упрощены и не включают всей сложности и динамики природных экосистем. Например, в лабораторных условиях температура, освещение и поступление питательных веществ обычно являются постоянными, в то время как в природной среде эти факторы изменчивы и могут существенно влиять на реакции организмов (Preston, 2002).

Во-вторых, выбор видов в живых модельных системах может привести к предвзятости результатов. Модельные организмы обычно выбираются на основе их экспериментальной пригодности, чувствительности к изменениям окружающей среды и репрезентативности биологических характеристик. Однако этот выбор видов не всегда может полностью отражать все многообразие и сложность биоты в экосистеме. Например, использование одного вида водорослей в качестве модельного организма для оценки воздействия загрязнения тяжелыми металлами не может полностью отражать потенциальный риск такого загрязнения для всей водной экосистемы, поскольку разные виды водорослей и другие водные растения могут обладать разной устойчивостью и механизмами ответа (Cairns, 1994).

В-третьих, временные рамки исследований на живых модельных системах ограничены. Хотя лабораторные исследования позволяют получать быстрые результаты за короткое время, они обычно не могут охватить долгосрочные экологические процессы и влияние изменений окружающей среды. Например, накопление тяжелых металлов в окружающей среде и биомагнификация могут занимать годы или даже десятилетия, в то время как лабораторные исследования обычно ограничены несколькими неделями или месяцами (Hickey & Clements, 1998).

В заключение, живые модельные системы имеют важное значение в

экологических исследованиях, предоставляя мощные инструменты для понимания воздействия загрязнителей на экосистемы, оценки экологических рисков и разработки стратегий управления окружающей средой. Однако исследователям следует учитывать ограничения этих систем и тщательно оценивать переносимость и реалистичность экспериментальных результатов. В будущих исследованиях следует совершенствовать дизайн живых модельных систем, сочетая использование различных модельных организмов и факторов окружающей среды для более комплексной оценки экологических рисков и потенциального воздействия изменений окружающей среды на экосистемы.

2.6.3. Использование модельных систем для прогнозирования экологических последствий

В экологических исследованиях модельные системы широко применяются для прогнозирования потенциальных последствий изменений в окружающей среде на экосистемы. Вводя различные экологические переменные в модельные системы, исследователи могут моделировать, как эти переменные взаимодействуют друг с другом, и оценивать их влияние на отдельные виды или целые экосистемы. Этот метод показал высокую ценность в таких областях, как прогнозирование изменения климата, распространение загрязняющих веществ и биологические инвазии (Grimm et al., 2005).

Прогнозирование воздействия изменения климата на экосистемы

Изменение климата стало одной из главных экологических проблем глобального масштаба. Используя модельные системы для моделирования потенциальных последствий изменения климата на экосистемы, исследователи могут определить, как повышение температуры, изменение режима осадков, повышение уровня моря и другие факторы влияют на структуру и функции экосистем. Например, моделирование в лаборатории различных температурных условий и концентраций CO₂ позволяет изучить, как эти изменения влияют на фотосинтетическую эффективность, скорость

роста и метаболические пути растений. Исследования показывают, что по мере повышения температуры фотосинтетическая эффективность некоторых видов растений может значительно снижаться, что, в свою очередь, может привести к изменениям в цикле углерода в экосистемах (Peñuelas & Filella, 2001).

Кроме того, модельные системы используются для прогнозирования воздействия изменения климата на определенные биологические сообщества. Например, моделирование системы коралловых рифов в условиях подкисления океана показывает, что снижение уровня pH и повышение температуры значительно снижают скорость кальцификации рифов, что негативно сказывается на выживании и росте кораллов. Эти результаты служат научной основой для разработки стратегий охраны и восстановления экосистем коралловых рифов (Hoegh-Guldberg et al., 2007).

Оценка распространения загрязняющих веществ и экологических рисков

Модельные системы также играют важную роль в оценке распространения загрязняющих веществ и их долгосрочных последствий для экосистем. Загрязняющие вещества (такие как тяжелые металлы, пестициды и стойкие органические загрязнители) могут проникать в экосистемы различными путями (например, атмосферные осадки, поверхностный сток) и оказывать вредное воздействие на живые организмы и окружающую среду. Используя модельные системы, исследователи могут моделировать пути распространения загрязняющих веществ, их биоаккумуляцию и динамику миграции в экосистемах. Например, изучение распространения и накопления тяжелых металлов в водных экосистемах с использованием водных модельных систем может помочь предсказать, как эти загрязнители будут накапливаться в пищевых цепях и какие потенциальные риски они представляют для высших хищников и здоровья человека (Chapman et al., 1998).

В этом контексте модельные системы не только помогают понять поведение загрязняющих веществ в окружающей среде, но и могут использоваться для тестирования различных стратегий управления окружающей средой и снижения выбросов загрязняющих веществ. Например, модели могут быть использованы для имитации различных стратегий применения пестицидов и прогнозирования того, как эти стратегии повлияют на концентрацию загрязняющих веществ в реках и озерах, предоставляя научные рекомендации для правительств и лиц, принимающих решения (Cambien et al., 2020).

Прогнозирование экологических последствий биологических инвазий

Биологические инвазии представляют собой одну из главных угроз для глобального биологического разнообразия. С помощью модельных систем исследователи могут прогнозировать, как инвазивные виды будут конкурировать с местными видами за ресурсы и при каких условиях они могут быстро размножаться и распространяться. Например, использование модельных систем для изучения инвазивных растений позволяет исследовать конкурентные преимущества инвазивных видов в различных условиях окружающей среды и их потенциальное влияние на местную флору (Jarnevich et al., 2020). Эти исследования помогают определить зоны высокого риска и установить приоритеты для управления инвазивными видами, что способствует разработке более эффективных мер борьбы.

Применение модельных систем в экологическом управлении

Помимо научных исследований, модельные системы также могут быть использованы для экологического управления и принятия решений. Моделируя различные стратегии управления (такие как охрана местообитаний, восстановление экосистем, контроль загрязнения и т.д.), модельные системы помогают оценить их потенциальные последствия и эффективность. Это позволяет менеджерам понять возможные результаты и риски до фактического внедрения мер, что оптимизирует процесс принятия

решений. Например, с помощью модельных систем можно смоделировать различные стратегии вылова рыбы и определить, как максимально увеличить экономическую выгоду при сохранении устойчивости рыбных ресурсов (Holden et al., 2024).

2.6.4. Как модельные системы имитируют или отклоняются от реальных условий окружающей среды

Несмотря на большой потенциал модельных систем в исследованиях окружающей среды и экологическом управлении, они также имеют определенные ограничения в имитации реальных условий окружающей среды. Понимание этих ограничений помогает правильно интерпретировать результаты исследований и эффективно использовать модельные системы на практике.

Способность моделировать условия окружающей среды

Одним из главных преимуществ модельных систем является их способность точно имитировать конкретные экологические факторы в контролируемых условиях. Такой контроль позволяет исследователям независимо управлять и тестировать различные переменные, такие как температура, интенсивность света, уровень питательных веществ и концентрация загрязняющих веществ (Dudgeon, 2010). Таким образом, модельные системы могут выявлять прямое влияние экологических факторов на определенные биологические процессы и предоставлять понимание того, как эти факторы влияют на естественные экосистемы. Например, лабораторные исследования показали, что увеличение интенсивности света может повысить фотосинтетическую эффективность водных растений, тем самым способствуя увеличению первичной продукции (Hader et al., 2007).

Модельные системы также позволяют моделировать совокупное воздействие множества стрессоров. В экспериментальных условиях можно одновременно управлять такими переменными, как температура, pH, концентрация загрязняющих веществ, чтобы наблюдать их комбинированное воздействие на модельные организмы. Такое многофакторное моделирование

помогает выявить механизмы реакции организмов на сложные условия окружающей среды и предоставляет научную основу для разработки более комплексных стратегий охраны природы (Baird & Van den Brink, 2007).

Ограничения и отклонения модельных систем

Однако, несмотря на многочисленные преимущества, модельные системы имеют значительные ограничения в воспроизведении сложностей природных условий. Во-первых, лабораторные условия обычно чрезмерно упрощены и не могут полностью отразить сложность и разнообразие природных экосистем. В реальных условиях различные экологические факторы часто взаимодействуют нелинейно, что приводит к трудно предсказуемым результатам, которые невозможно полностью воспроизвести в лаборатории (Carpenter, 1996). Например, в природе сезонные изменения, погодные колебания и сложные межвидовые взаимодействия (такие как хищничество, конкуренция и симбиоз) совместно влияют на рост и распространение организмов, и эти факторы обычно изолированно исследуются в модельных системах, что ограничивает обобщаемость результатов исследований (Schindler, 1998).

Во-вторых, популяции в модельных системах обычно очень ограничены и упрощены. Например, в лабораторных условиях использование одного вида (например, водорослей) для моделирования целой водной экосистемы может упустить из виду сложные пищевые взаимоотношения и экологические функции между разными популяциями. Такое упрощение может привести к переоценке или недооценке общей реакции экосистемы (DeAngelis & Waterhouse, 1987). Поэтому результаты, полученные в модельных системах, следует интерпретировать с осторожностью, особенно при их применении для широкомасштабных управленческих решений.

Повышение практической применимости модельных систем

Для повышения практической применимости модельных систем исследователи постоянно совершенствуют экспериментальный дизайн и методологию. Одним из распространенных подходов является использование

многовидовых модельных систем, которые включают в себя несколько различных видов и функциональных групп для более полного отражения сложности природных экосистем. Например, введение в эксперимент нескольких видов хищников и жертв позволяет лучше смоделировать сложные пищевые отношения и динамику изменений в экосистеме (Petchey et al., 2004).

Кроме того, ученые стремятся разрабатывать и применять более сложные численные модели, которые могут интегрировать информацию из множества источников данных (таких как экспериментальные данные, данные полевых наблюдений и данные дистанционного зондирования), чтобы точнее моделировать сложные процессы в природной среде. Например, климатические и гидрологические модели часто сочетают различные физические, химические и биологические процессы для прогнозирования воздействия изменения климата на экосистемы (Schneider et al., 2017). Применение таких комплексных моделей повышает точность и надежность прогнозов и обеспечивает более прочную научную основу для экологического управления.

Таким образом, модельные системы имеют незаменимое значение в экологических исследованиях и управлении окружающей средой. Они предоставляют эффективный инструмент для понимания последствий изменений в окружающей среде, прогнозирования будущих изменений в экосистемах и содействия разработке научно обоснованных стратегий управления окружающей средой. Однако ограничения модельных систем также напоминают нам о необходимости осторожного подхода при использовании этих инструментов, особенно при экстраполяции лабораторных результатов на реальные экосистемы. Будущие исследования должны продолжать совершенствовать методы использования модельных систем, сочетая различные модельные системы и сложные источники данных для более точного моделирования сложностей и динамики природных экосистем.

На практике использование модельных систем способствует не только научным исследованиям, но и имеет важное значение для политиков и управляющих органов. Глубокое понимание возможностей и ограничений модельных систем позволяет эффективнее реагировать на глобальные изменения окружающей среды и экологические кризисы, а также продвигать цели устойчивого развития и охраны природы.

3. Материалы и методы исследования

3.1. Культивирование клеток и подготовка проб

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} .

Для серий экспериментов по влиянию ионов меди и серебра на рост клеток маточную культуру *Scenedesmus quadricauda* подготавливали в процессе культивации в среде Прата в течение 7 дней в климатостате (RDN-560B-3, Китай) с автоматическим чередованием дня (16 часов, PPDF $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) и ночи (8 часов) на помещенный в климатостат шейкер для постоянного перемешивания суспензии клеток (120 об/мин). После этого производилась подготовка проб с плотностью – $2,5 \times 10^5$ клеток мл^{-1} в прозрачных флаконах по 15 мл, которые после этого помещались в те же условия. После этого подсчет клеток, измерение сухого остатка и относительной переменной флуоресценции (F_v/F_m) проводили каждые сутки в одно и тоже время в течение 8-ми суток.

Культивирование цианобакрети - *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.

3.1.1. Подсчет количества клеток в суспензии

Контроль количества клеток в суспензии проводился с помощью их подсчета с использованием камеры Горяева и тринокулярного микроскопа Zeiss/Axio Lab A1. Подсчитывалось количество клеток в 5-ти больших квадратах методом конверта – по большим квадратам в вершинах и в центре поля с насечками. После чего концентрация клеток определялась по следующей формуле:

$$C = N \cdot 5 \cdot 10^4 \text{ (клеток/мл)},$$

где N – сумма клеток в 5-ти посчитанных квадратах.

3.2. Измерения абсорбции

Спектры затухания $A(\lambda)$ регистрировали в спектральном диапазоне 400 - 800 нм на ручном однолучевом спектрофотометре, оснащённом интегрирующей полостью. Использовалась кварцевая кювета диаметром 1 см. В качестве источника света и детектора света использовали галогенную лампу и CCD -спектрометр (USB2000, OceanOptics, США) соответственно. Интегрирующая полость значительно уменьшает неспецифическое ослабление света, возникающее из-за рассеяния света в мутных образцах, но не устраняет его полностью. Чтобы быть ближе к истинному поглощению, применялась упрощенная поправка на рассеяние. Для каждого спектра ослабления $A(\lambda)$ оценивалось значение смещения A_{750} , которое затем вычиталось. Полученный спектр $A^*(\lambda) = A(\lambda) - A_{750}$ далее будет **называться спектром поглощения**. Изменения содержания хлорофилла и каротиноидов отслеживались *in vivo* с помощью спектров A^*_{678} и A^*_{480} , соответственно. Измерение абсорбции цианобактерий проводили на спектрофотометре SHIMADZU UV2600i (Япония).

3.3. Основная 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 мл⁻¹), чтобы избежать самозатенения и реабсорбции флуоресценции. Затем образцы водорослей подвергали воздействию 0 (контроль), 0,1, 1, 10 мкМ CuSO₄ и 0,05, 0,1, 1 мкМ AgNO₃ в течение 2 и 24 ч. Одну группу пробирок держали в темноте, а другую - при непрерывном освещении люминесцентными лампами при PPFD 50 мкмоль м⁻² с⁻¹.

Концентрация цианобактерий в пробах составляла примерно $4,0 \times 10^7$ клеток • мл⁻¹. При этом действии меди и серебра было в концентрациях 10-80 и 1-10 мкМ соответственно.

3.4. 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 • мл⁻¹. Контрольные образцы и образцы с CuSO₄ и AgNO₃ помещали в климатостат с температурой $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и постоянном встряхивании (120 об/мин) при автоматическом чередовании дня (16 часов, с PPFD 50 мкмоль м⁻² с⁻¹) и ночи (8 часов). Подсчет численности клеток, сухой массы и параметра - F_v/F_m (относительная переменная флуоресценция) в образцах проводили каждые сутки в одно и тоже время в течение 8-ми суток.

3.5. Измерения флуоресценции хлорофилла *a*

3.5.1. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла *a*

Кривые индукции флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали в суспензиях водорослей, адаптированных к темноте, с помощью флуориметра AquaPen-C AP-C 110 (Photon Systems Instruments, Чехия). PPFD и длительность вспышки синего актиничного света ($\lambda = 455$ нм) составляли 3000 мкмоль м⁻² с⁻¹ и 2 с соответственно. Кинетику светоиндуцированной флуоресценции хлорофилла *a* анализировали с помощью JIP-теста, предложенного в работах (Strasser, Strasser, 1995; Strasser et al., 2004) (таблица 3.1).

Таблица 3.1 - Параметры и расчетные индексы JIP-теста анализа кинетики флуоресценции хлорофилла *a* (Strasser, Strasser, 1995; Strasser et al., 2004)

Параметр флуоресценции	Описание
F_o, F_J, F_I, F_m	Интенсивности флуоресценции при 0,05 (уровень O), 2 (пик J), 30 (пик I) мс и максимальная флуоресценция во время пика P
$V_J = (F_J - F_o)/F_v$	Относительная переменная флуоресценция пика J
$V_I = (F_I - F_o)/F_v$	Относительная переменная флуоресценция пика I
$\Delta J = V_{J(\text{токсикант})} - V_{J(\text{контроль})}$	Разность значений функций V_J контроля и токсиканта
$\Delta I = V_{I(\text{токсикант})} - V_{I(\text{контроль})}$	Разность значений функций V_I контроля и токсиканта
$M_0 = 4 \times (F_{300\text{мкс}} - F_o)/F_v$	Начальный наклон (в мс^{-1}) индукции флуоресценции $V = f(t)$
$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$	Максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФСII
$\psi_{E_o} = 1 - V_J$	Вероятность того, что захваченный экситон перемещает электрон за пределы Q_A^-
$\phi_{E_o} = F_v/F_m \times \psi_{E_o}$	Квантовый выход электронного транспорта
$\delta_{R_o} = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Вероятность, с которой электрон от межсистемных электронных переносчиков перемещается к конечным акцепторам в ФСI
$\phi_{R_o} = F_v/F_m \times (1 - V_I)$	Квантовый выход восстановления конечных акцепторов в ФСI
$\phi_{D_o} = 1 - F_v/F_m$	Квантовая эффективность рассеивания энергии в виде тепла
$ABS/RC = M_0 \times (V_J \times F_v/F_m)^{-1}$	Поглощаемый поток энергии на РЦ
$DI_o/RC = M_0 \times (1 - F_v/F_m) \times (V_J - F_v/F_m)^{-1}$	Рассеиваемый поток энергии на РЦ
$PI_{ABS} = (ABS/RC)^{-1} \times F_v/F_m \times (1 - F_v/F_m)^{-1} \times \psi_{E_o} \times (1 - \psi_{E_o})^{-1}$	Показатель функциональной активности ФСII, отнесенной к поглощаемой энергии (индекс производительности ФСII)

В кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* выделяют несколько фаз, известных как O-J-I-P переходы, отражающие последовательное восстановление переносчиков электронов в электрон-транспортной цепи

(ЭТЦ), главным образом, в ФСII. Начальный уровень флуоресценции (уровень O , F_o) соответствует интенсивности при «открытых» РЦ, когда хинонный акцептор Q_A находится в окисленном состоянии. Участок O - J обусловлен светоиндуцированным восстановлением Q_A , а последующая фаза J - I - P отражает дальнейшее накопление восстановленного Q_A в результате восстановления акцепторов Q_B и пула пластохинонов (PQ), а также конечных акцепторов в ФСII (Stirbet, Govindjee, 2011). Индукционная кривая достигает своего максимума при ~ 200 мс, когда РЦ переходят в «закрытое» состояние с восстановленным Q_A (уровень P , F_m).

Поскольку предполагалось, что медь и серебро существенно влияет на оптические свойства фотосинтезирующих клеток, мы рассчитали специфичные для $A*455$ значения F_o (F^*_o) и F_m (F^*_m), чтобы точно отслеживать влияние токсикантов на фотохимическое и нефотохимическое тушение независимо от одновременного изменения содержания клеток, содержания пигментов и упаковки пигментов.

3.5.2. Индукционные кривые (Переходные процессы) флуоресценции отдельных клеток

Индукционные кривые (переходные процессы) флуоресценции отдельных клеток 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). В целях экономии времени определяли только OJ -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: $\Phi_{PSII} = (F_{st} - F_o) / F_{st} = \Delta F / F_{st}$.

3.5.3. Световые кривые относительной скорости линейного электронного транспорта (rETR) и NPQ

Кривые быстрого светового отклика измеряли с помощью флюорометра Water-PAM (Walz, Германия) при последовательном увеличении интенсивности актиничного света (0 – 1400 мкмоль/м²/с–1); продолжительность каждого светового шага составляла 20 с. Фактический (F_t) и максимальный (F_m') уровни флуоресценции измеряли в конце каждого этапа освещения. Величину F определяли при каждом уровне освещенности, а F_m' определяли путем подачи импульса насыщающих вспышек продолжительностью 0,8 с и интенсивностью приблизительно 3000 мкмоль м⁻² с⁻¹. NPQ рассчитывали в соответствии с соотношением Штерна–Фольмера как $NPQ = F_m/F_m' - 1$, где F_m' – максимальная флуоресценция в адаптированном к свету состоянии после подачи импульса насыщения. Относительная скорость переноса электронов (ETR) была рассчитана как $ETR = FPSII \times \text{интенсивность света} \times 0,5$.

3.5.4. Кривые затухания флуоресценции

Исследованы индуцированные лазером пикосекундные кривые затухания флуоресценции в клеточных суспензиях и на отдельных клетках.

Затухание флуоресценции в клеточных суспензиях анализировали с помощью коррелированного по времени подсчета одиночных фотонов. Система регистрации состояла из платы SPC 150 (Becker & Hickl), гибридного детектора HPM 100-40 (Becker & Hickl), монохроматора ML44 (Solar) и фемтосекундного возбуждающего лазера TOPOL (Avesta Project LTD). Длина волны возбуждения 450 нм и спектральная полоса детектирования 690±10 нм. Для анализа зарегистрированных затуханий флуоресценции применялась процедура двухэкспоненциальной аппроксимации (подгонки).

Амплитуду и время жизни флуоресценции в отдельных клетках изучали с помощью системы "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy", описанной ранее (Semenov et al, 2023).

Кинетики затухания были определены на одних и тех же изображениях клеток для двух разных спектральных диапазонов эмиссии - для 680нм и для 530нм. Среднее время жизни, t_m , рассчитывали по формуле: $t_m = A_1\tau_1 + A_2\tau_2$ после предварительной нормировки амплитуд $A_1 + A_2 = 1$.

3.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния света

Спектры комбинационного рассеяния света образца измеряли с помощью конфокального рамановского микроскопа inVia Qontor (Renishaw, Великобритания). Длина волны возбуждающего лазера составляла 488 нм. Используемые в эксперименте параметры были: дифракционная решетка - 2400 л/мм (линии на миллиметр), объектив - 50×, время экспозиции - 10 с, мощность лазера 10% от $t_{max} = 50$ МВт, одна повторность измерения, спектральный диапазон 800-1800 см^{-1} . Препараты для измерения готовились с помощью нанесения капли 20 мкл суспензии клеток, соответствующего образца на предметное стекло, которую накрывали покровным стеклом. После двухминутной выдержки, приготовленного препарата капля растекалась по всей площади под покровным стеклом и частично подсыхала по краям. После этого в поле зрения микроскопа выбирались клетки случайным образом и производилась регистрация спектра комбинационного рассеяния.

3.7. Сканирующая электронная микроскопия

Исследовано влияние ионов меди и серебра на морфологию клеточной стенки микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* после их 24-х часовой инкубации с помощью метода электронной сканирующей микроскопии (СЭМ). Препараты для СЭМ готовили на специальных подложках, к которым крепился двухсторонний углеродный скотч, на который наносились капли суспензий клеток образцов микроводорослей. После высыхания препаратов они напылялись золотом для увеличения проводимости с помощью вакуумного ионно-распылительного устройства (SBC-12, Китай). После напыления образцы помещали в вакуумную камеру сканирующего электронного микроскопа KYKY-EM6200 (KYKY Technology Co., LTD.,

Китай). Как только вакуум в камере достигал более 3×10^{-5} Торр, проводили сканирование и фотографирование образцов. Необходимые параметры микроскопа и получение фотографий образцов контролировались с помощью оригинального программного обеспечения – КУКУ-ЕМ6Х00. Основные параметры микроскопа были установлены следующим образом: ток насыщения нити накала – 2,5А, высокое напряжение - 16 кВ. Увеличение микроскопа составило от 3,00 до 5,00 тыс.

3.8. Статистическая обработка и представление полученных данных

Экспериментальные исследования проводились в трёх независимых сериях, каждая из которых включала не менее трёх параллельных повторностей для каждого исследуемого образца. Такой подход обеспечивал высокую степень достоверности и воспроизводимости полученных результатов, позволяя исключить влияние случайных факторов.

Первичная обработка данных, расчёт статистических параметров и визуализация результатов выполнялись с использованием пакетов прикладных программ Statistica, версия 13.3.704.19 (StatSoft, Inc., 2025; <http://www.statsoft.com>), Microsoft Excel и OriginPro, версия 2023b. Для каждого показателя рассчитывались средние арифметические значения (M) и соответствующие стандартные ошибки среднего ($\pm SEM$).

Стандартная ошибка среднего (SEM) находилась как:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

Где:

σ — стандартное отклонение выборки,

n — число наблюдений (повторностей).

Для оценки статистической значимости различий между сравниваемыми группами использовался двусторонний t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$, если иное не указано. При необходимости нормальность распределения проверялась с использованием теста Шапиро–

Уилка, а гомогенность дисперсий — с применением критерия Левена.

В случае анализа более двух групп данных применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). При выявлении значимых различий между выборками по результатам ANOVA проводились множественные апостериорные сравнения с использованием критерия Тьюки или теста Даннета, в зависимости от структуры данных.

Построение графиков, включая столбчатые диаграммы с ошибками, зависимости и кривые, выполнялось в OriginPro и Excel. Все графики сопровождалось обозначением достоверных различий между группами, отражающих результаты статистического анализа.

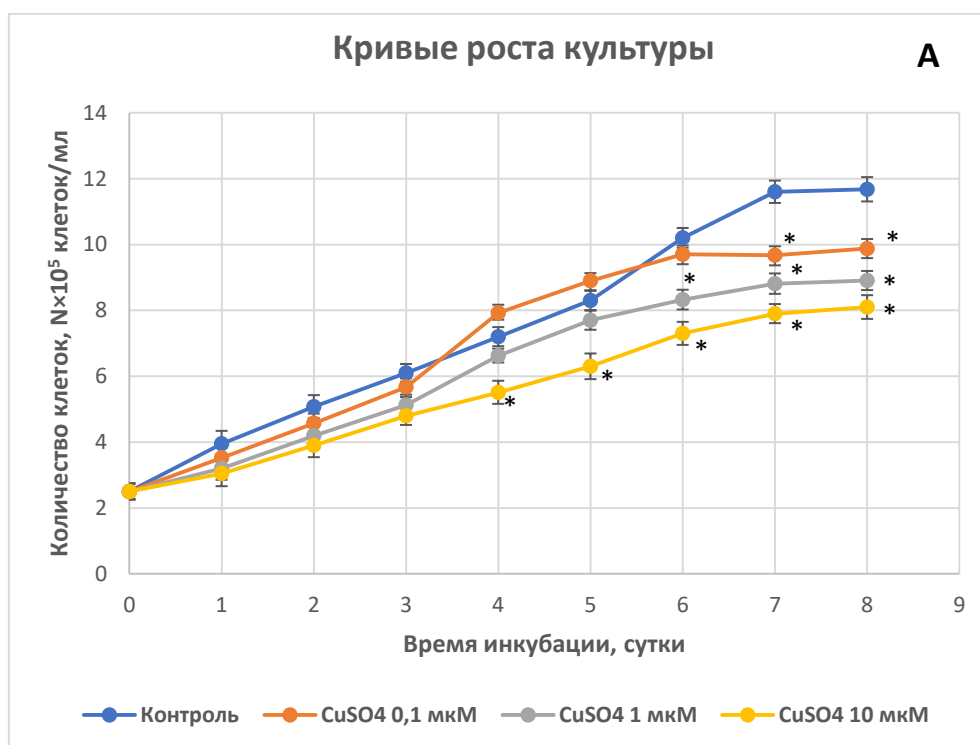
4. Результаты и обсуждение

4.1. 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 4.1.1 представлены данные по влиянию ионов меди (А) и серебра (Б) на кинетику роста популяции *Scenedesmus quadricauda*.

Из рис.4.1.1.А 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.



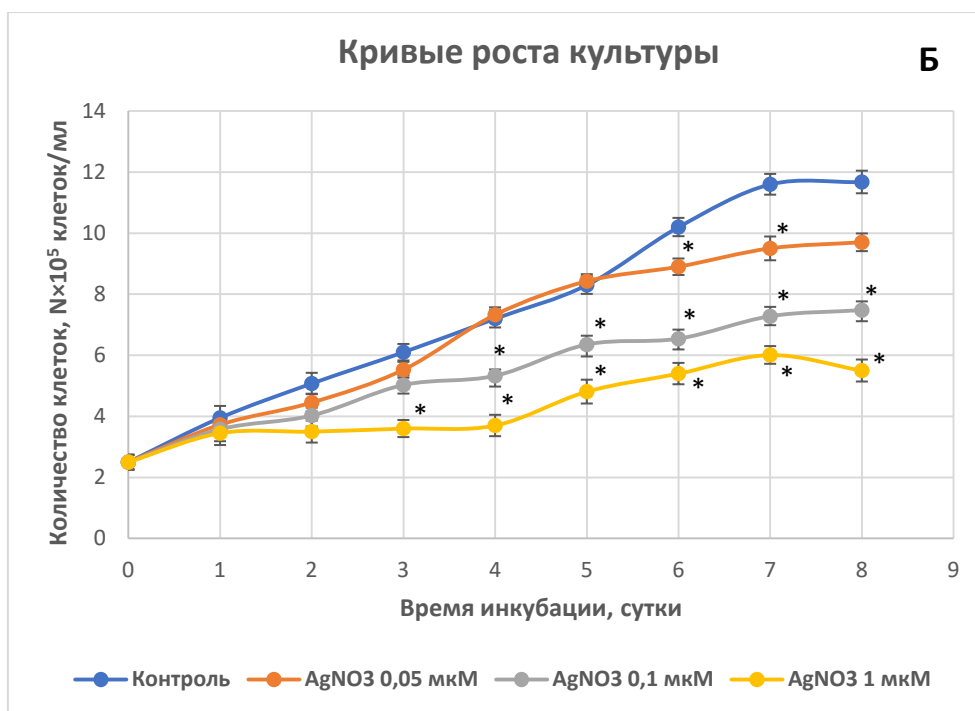


Рис.4.1.1. Влияние Cu^{2+} (А) и Ag^+ (Б) на рост популяции в суспензии культуры микроводоросли *S. quadricauda*. Инкубация клеток проводилась при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при температуре 24°C . * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

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 4.1.1 и 4.1.2 данные по влиянию ионов меди и серебра, соответственно, на сухой остаток в экспериментальных образцах коррелируют с данными по кинетике роста культур. Так при концентрации меди 10 мкМ наблюдается снижение роста, исследуемого параметра на 4-е сутки инкубации.

Таблица 4.1.1. 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 4.1.2. 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.4.1.1.Б).

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 4.1.3. 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 4.1.4. 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 4.1.3 и 4.1.4 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 методов 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.

4.2. Исследование воздействие ионов Cu^{2+} в разных концентрациях на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* с помощью спектральных

методов при культивации водорослей с ионами Cu^{2+} в темновых и световых условиях.

Опыт по действию меди был поставлен в двух вариантах – в темноте и при постоянном освещении. Хотя световое воздействие часто усиливает повреждающее действие неблагоприятных факторов на фотосинтетический аппарат клеток водорослей, мы считаем, что инкубация клеток при световом облучении с точки зрения метаболизма клеток является более физиологичным вариантом опыта. Поэтому первым делом рассмотрим то, как действует медь при постоянном облучении. Особенности ее влияния в условиях темнового метаболизма будут рассмотрены отдельно.

4.2.1. Действие меди на пигментный состав в культуре микроводоросли *S. quadricauda* при инкубации на свету

Опыт по действию меди был поставлен в двух вариантах – в темноте и при постоянном освещении. Хотя световое воздействие часто усиливает повреждающее действие неблагоприятных факторов на фотосинтетический аппарат клеток водорослей, мы считаем, что инкубация клеток при световом облучении с точки зрения метаболизма клеток является более физиологичным вариантом опыта. Поэтому первым делом рассмотрим то, как действует медь при постоянном облучении. Особенности ее влияния в условиях темнового метаболизма будут рассмотрены отдельно.

Результаты по спектрам поглощения

Исследовано влияние ионов меди на поглощение в области хлорофилла *a* (678 нм) при световых условиях инкубации. Как видно из рисунка 4.2.1., за 24 часа в закрытом флаконе в контрольных условиях увеличения содержания хлорофилла не происходит. Оптическая плотность в образцах с содержанием меди 0, 0,1 и 1 мкМ сохраняется на уровне 0,04, который был задан при начальном разведении маточной культуры во время ее пересадки в экспериментальные пробирки.

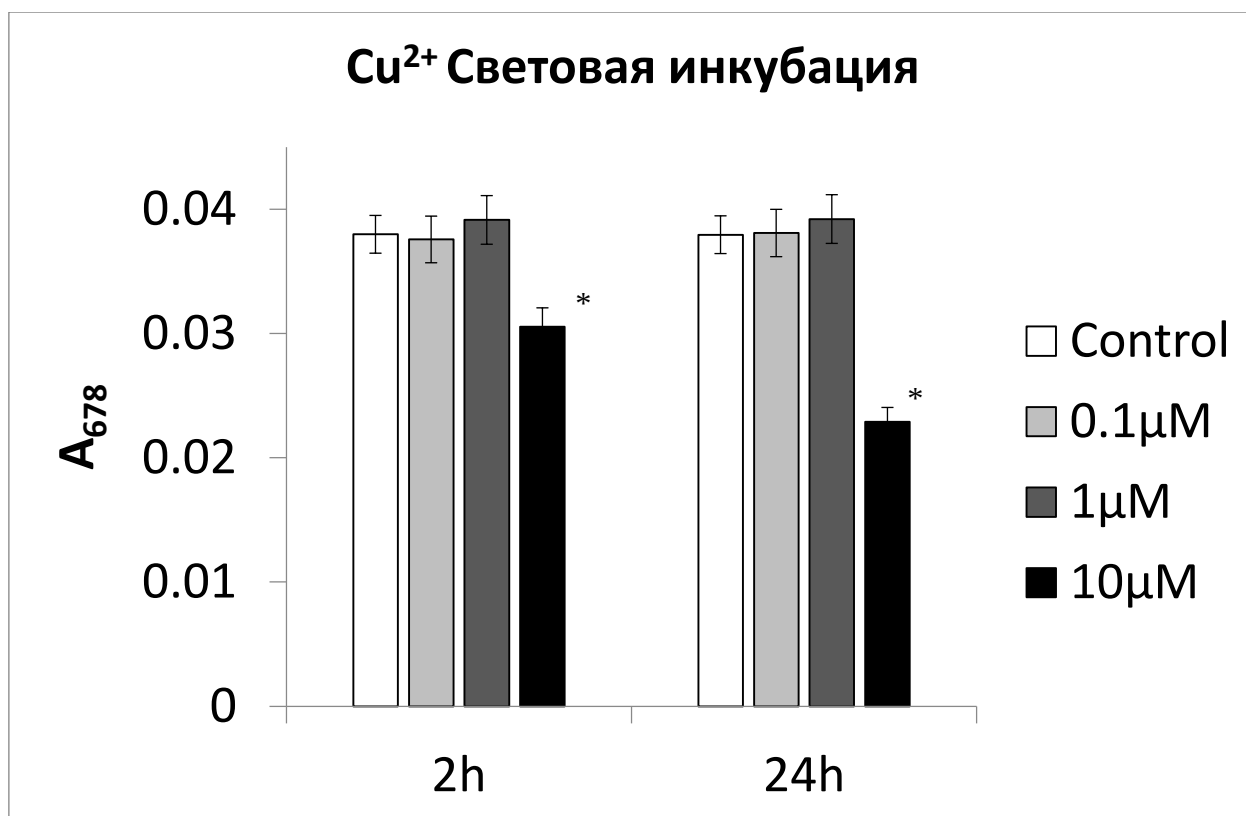


Рис.4.2.1. Изменение оптической плотности в полосе поглощения хлорофилла «а» ($\lambda_{\max}=678$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью * Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Действие меди в концентрации 10 мкМ сопровождается уменьшением оптической плотности: на четверть через первые 2 часа и почти в двое через сутки (рис.4.2.1.).

Также исследовано влияние ионов меди на поглощение в области полосы каротиноидов (480 нм) при световых условиях инкубации.

Поглощение каротиноидов также слабо изменяется во времени инкубации при концентрациях меди 0, 0,1 и 1 мкМ, но постепенно уменьшается при действии меди в концентрации 10 мкМ (рис.4.2.2.).

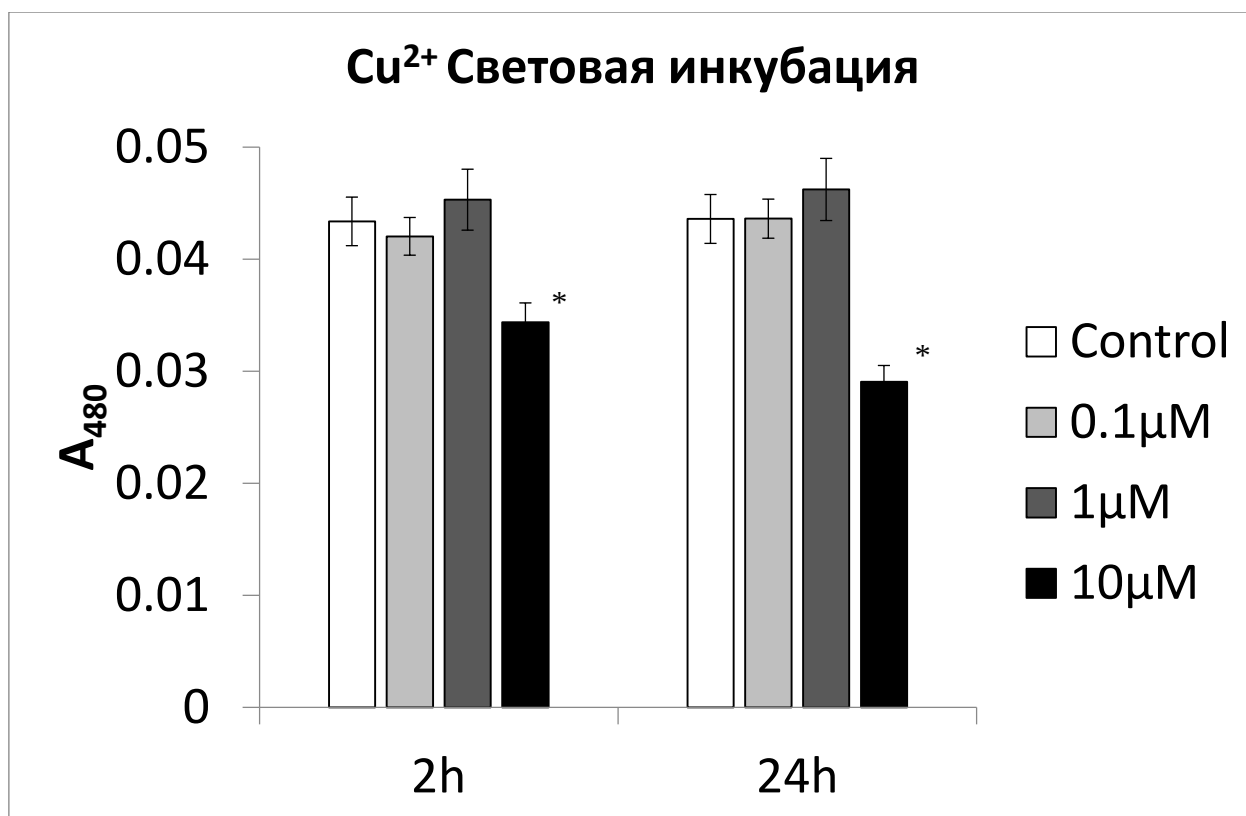


Рис. 4.2.2. Изменение оптической плотности в полосе поглощения каротиноидов ($\lambda_{\text{max}}=480$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

По результатам измерений в двух полосах мы исследовали отношение поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов.

Из рис.4.2.3. видно, что отношение поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов через 2 часа инкубации практически не изменяется. Обнаружено уменьшение не более чем на 10% через 24 часа инкубации с медью в концентрации 10мкМ.

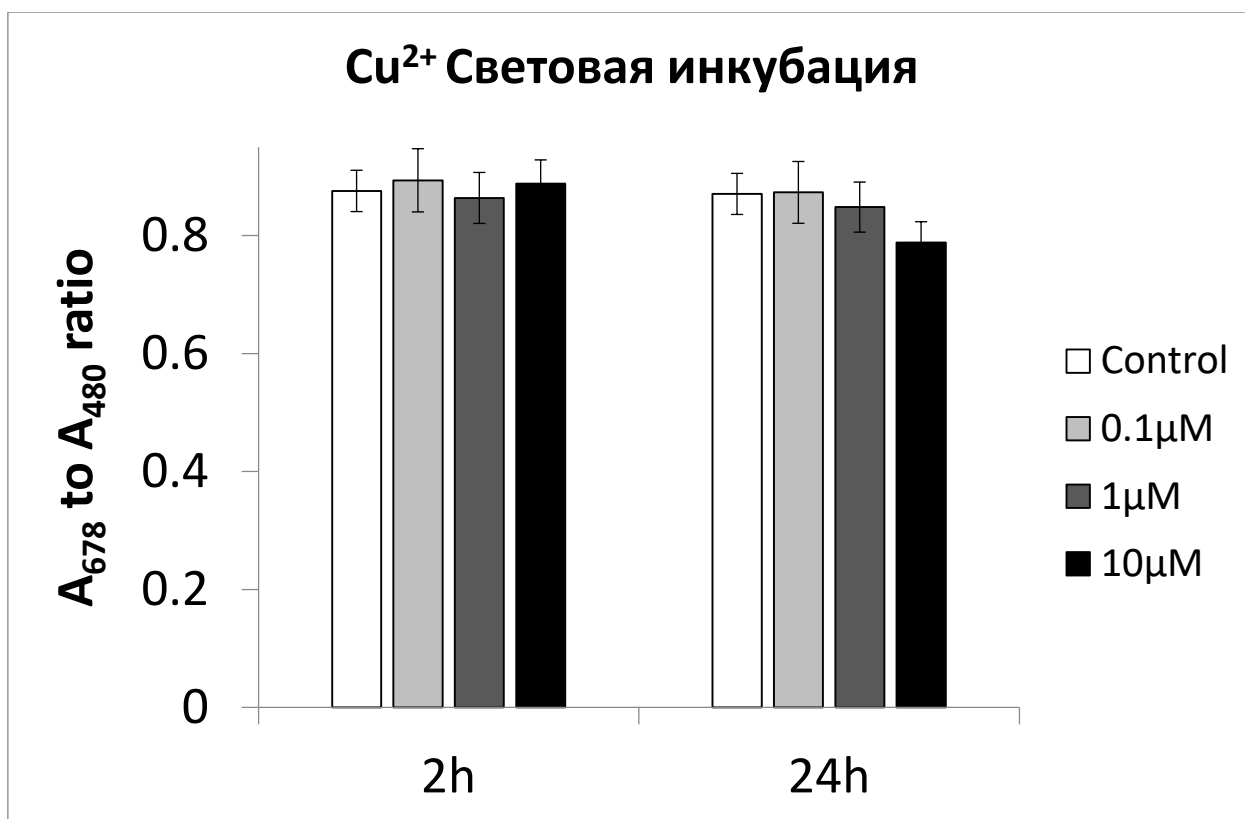


Рис. 4.2.3. Изменение отношения интенсивности поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Таким образом из рисунков 4.2.1-3. следует, что в контрольных условиях и при низких концентрациях меди содержание хлорофилла и каротиноидов практически не изменяется. При относительно высокой концентрации меди (10 мкМ) наблюдается постепенное разрушение хлорофилла и каротиноидов. При этом каротиноиды оказываются более устойчивыми к повреждению, что может быть проявлением адаптационных процессов к стрессорным условиям. Поскольку изменение содержания пигментов в суспензии влияет на интенсивность флуоресценции хлорофилла (параметры F_o и F_m), данное изменение необходимо учитывать при анализе данных флуоресценции. Мы учитывали это влияние путем расчета удельных параметров F_o^* и F_m^* , чтобы отслеживать влияние меди отдельно на фотохимическое тушение и отдельно на нефотохимическое тушение

возбужденных состояний хлорофилла (это будет отмечено далее в работе).

4.2.2. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток *S. quadricauda* при их инкубации в световых условиях

Мы исследовали влияние меди 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).

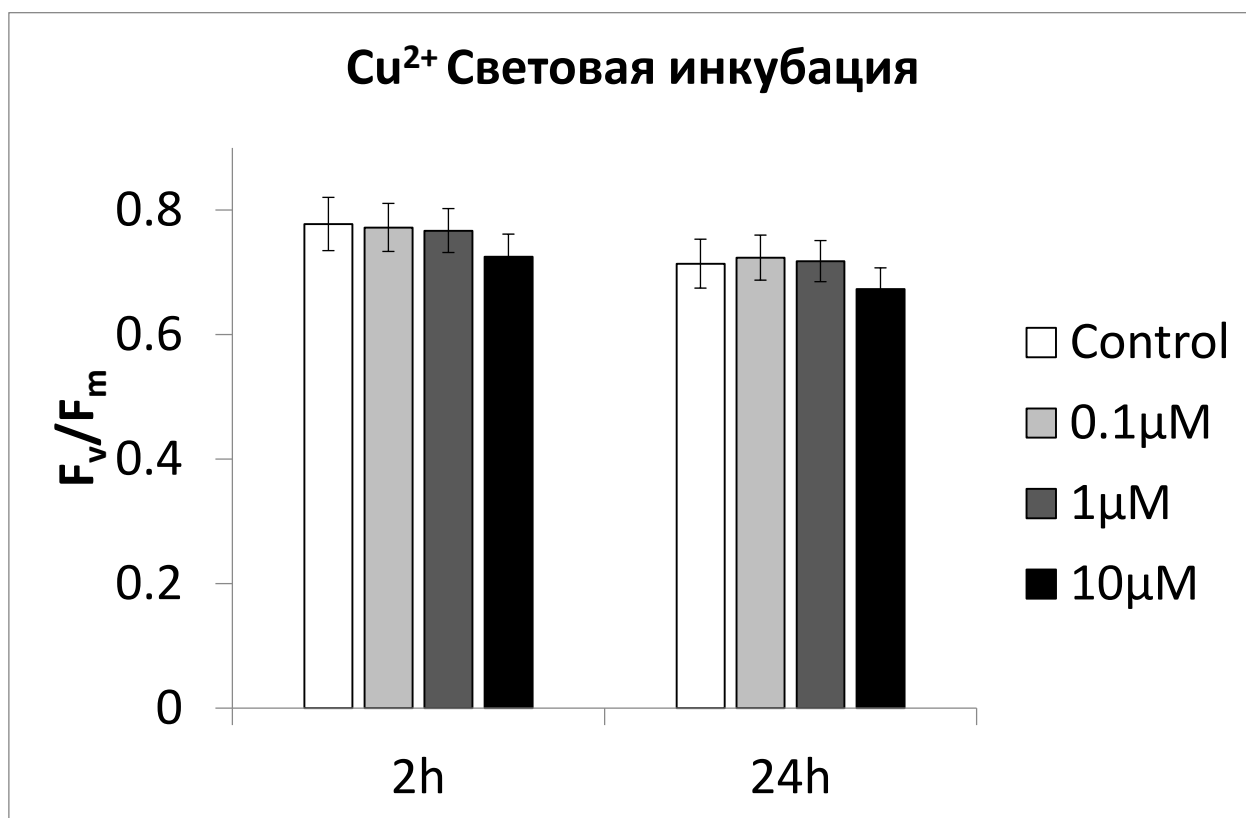


Рис. 4.2.4. Изменение относительной переменной флуоресценции хлорофилла культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Относительная переменная флуоресценция хлорофилла в контрольных условиях уменьшается от 0,78 при 2ч измерении до 0,7 при 24ч измерении

(рис. 4.2.4). Медь в концентрациях 0,1 и 1 мкМ не влияет на значение F_v/F_m . Небольшое снижение F_v/F_m , на уровне нескольких процентов от контроля, можно наблюдать лишь при концентрации меди 10 мкМ.

Для уточнения предполагаемых нами механизмов мы посмотрели, как изменяются отдельно F_0 и F_m . Чтобы исключить зависимость F_0 и F_m от концентрации пигментов, мы делили исходные значения F_0 и F_m на оптическую плотность суспензии при длине волны возбуждения флуоресценции 450 нм.

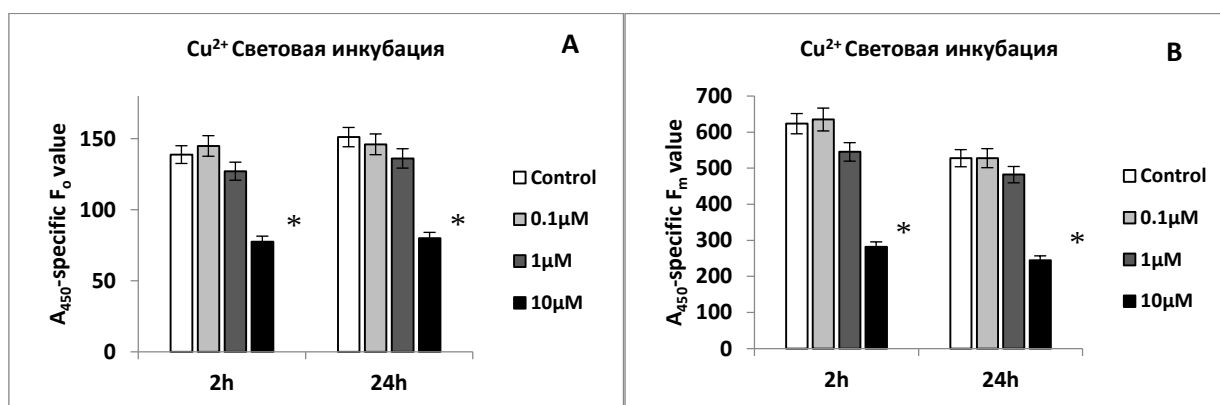


Рис. 4.2.5. Изменение удельных значений минимальной (А) и максимальной флуоресценции (В) (в расчете на единицу поглощенной световой энергии) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Удельное значение интенсивности минимальной флуоресценции в расчете на единицу поглощенной световой энергии (F_0^*) в контроле с течением времени изменяется несущественно. Возможно имеет место его увеличение, но не более чем на 7% от 2ч к 24ч (рис. 4.2.5А), что может говорить о появлении небольшого числа закрытых реакционных центров фотосистемы 2 (РЦ с восстановленным Q_A) в темновых условиях (темновая адаптация несколько минут необходима перед подачей импульса света, вызывающего флуоресценцию молекул, измеряемого образца). Т.е. появление, удельная максимальная флуоресценция (F_m^*) в контроле снижается примерно

на 16% от 2ч к 24ч (рис. 4.2.5Б), что указывает на формирование некоторого уровня нефотохимического тушения в темновых (перед измерением) условиях. Возможно появление закрытых РЦ и некоторого уровня нефотхимического тушения является следствием адаптации клеток водорослей к условиям освещенности. Это связано с тем, что маточная культура росла в большем объеме, тогда как экспериментальные образцы росли в более тонких пробирках, в которых ослабление света клетками менее существенно.

В концентрации 0,1мкМ медь не оказывает какого-либо действия на показатели F^*_o и F^*_m в сравнении с контролем (рис. 4.2.5). При более высоких концентрациях, медь вызывает уменьшение и F^*_o и F^*_m , более выраженное при максимальной концентрации - 10мкМ, что указывает на сильное тушение возбужденных молекул хлорофилла по нефотохимическому пути.

4.2.3. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках *S. quadricauda* при их инкубации в световых условиях

В дополнение к измерениям флуоресценции на суспензиях клеток (усредненные показатели по ансамблю клеток) мы провели измерения флуоресценции на одиночных клетках. Хорошо известно, что клетки в популяции сильно отличаются друг от друга по размеру, по содержанию фотосинтетических пигментов и по характеристикам первичных процессов фотосинтеза (Kuznetsov A. G., I et al 2021; Riznichenko G. Y., et al 1996.) Мы также ожидали, что клетки водорослей могут отличаться друг от друга и по чувствительности к токсиканту.

В более ранних работах по токсическому действию ионов меди было отмечено интенсивное тушение флуоресценции хлорофилла (Nirupama Mallick, F.H Mohn, 2003). Это подтверждается и нашими данными, полученными на суспензиях клеток (рис. 4.2.5, снижение F_o и F_m при концентрации меди - 10 мкМ). Те клетки, в которых действие меди оказалось наиболее сильным, будут флуоресцировать слабо и потому практически не

будут видны в усредненном сигнале флуоресценции в суспензии. Чтобы увидеть эти клетки и изучить их свойства мы провели измерения на одиночных клетках.

На рис.4.2.6 каждой точке соответствует одна клетка.

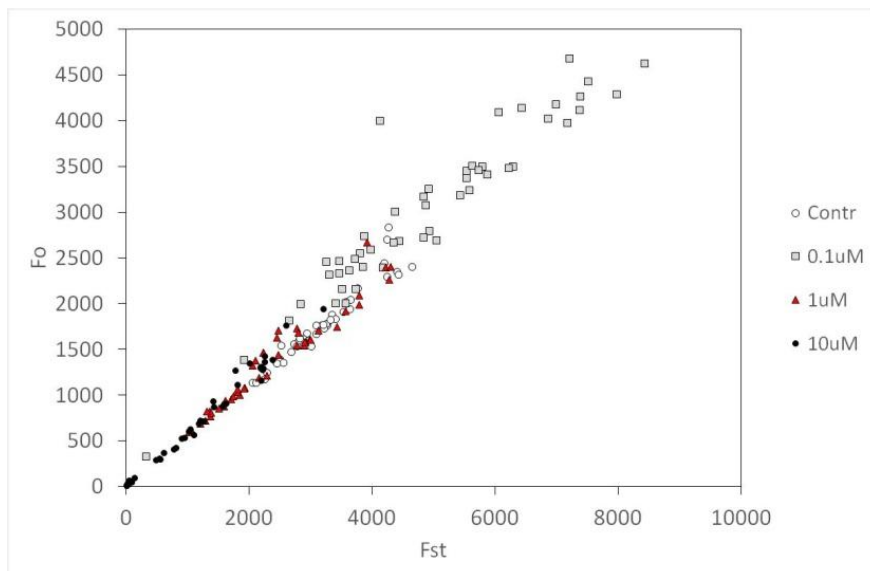


Рис.4.2.6. Соотношения между интенсивностью максимальной (F_{st}) и интенсивностью минимальной (F_o) флуоресценции клетки в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии ионов меди. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Интенсивности минимальной (F_o на клетку) и максимальной (F_{st} на клетку) флуоресценции изменяется в контрольных условиях от клетки к клетке не меньше, чем в 3 раза.

По данным FRR-микрофлуориметрии нами были рассчитаны также средние на клетку значения F_o и F_{st} (рис. 4.2.7). В целом можно отметить, что удельные показатели на одну клетку изменяются в опытах с медью гораздо сильнее, чем те же показатели в расчете на единицу поглощенной энергии (рис. 4.2.5, 24ч), что говорит о потенциально более высокой чувствительности флуориметрии одиночных клеток при исследованиях действия токсикантов на клетки микроводорослей. В нашем конкретном случае удельные значения F_o и F_{st} в зависимости от концентрации меди

изменялись немонотонно. В случае микрофлуориметрии в концентрации 0,1мкМ было зафиксировано увеличение F_0 и F_{st} , а при больших концентрациях (1 и 10мкМ) уменьшение, причем для концентрации 10мкМ удельные параметры снижались в 3 раза относительно контроля (рис. 4.2.7).

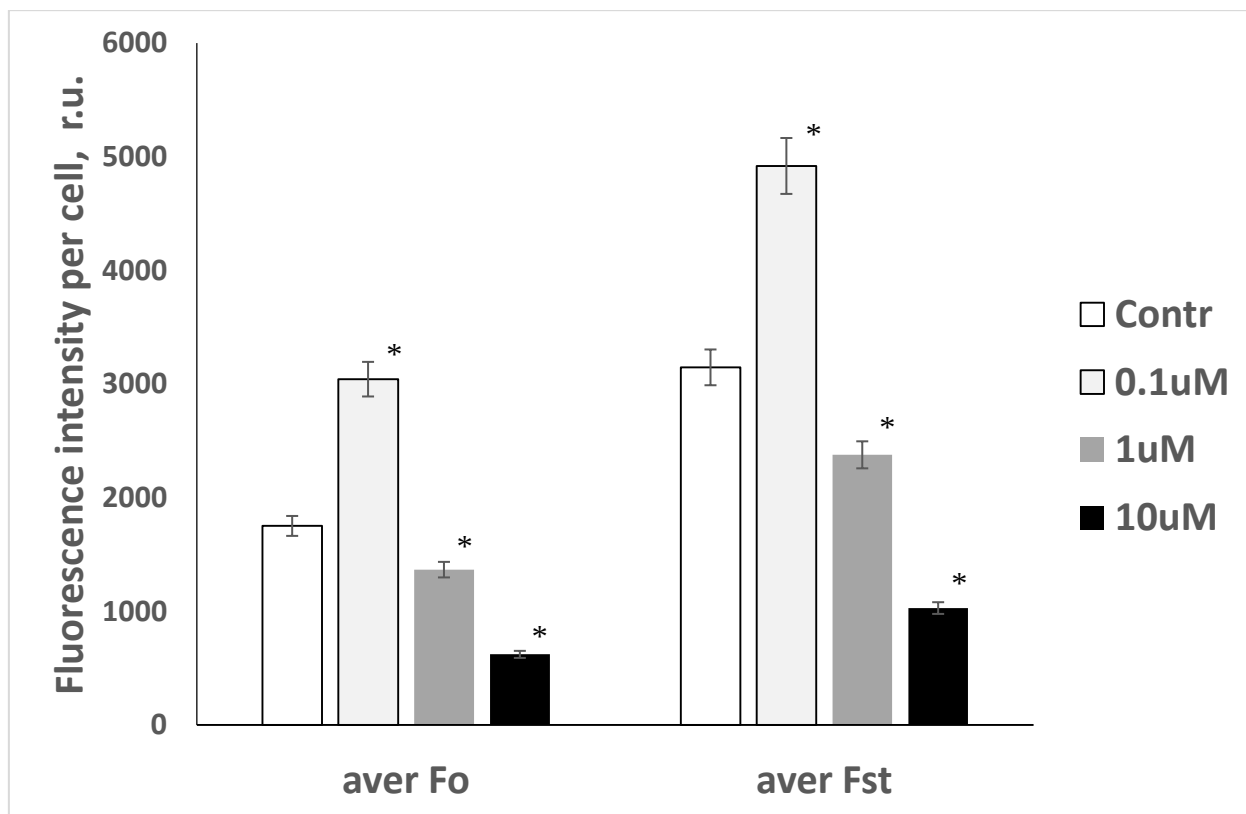


Рис.4.2.7. Средние значения минимальной (F_0) и максимальной (F_{st}) флуоресценции на одну клетку культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Увеличение интенсивностей F_0 и F_{st} на клетку при концентрации меди 0,1мкМ (рис. 4.2.7) понять сложно, учитывая то, что общее содержание пигментов в суспензии в сравнении с контролем не изменялось (рис. 4.2.1. и рис. 4.2.2., 0,1мкМ). Вероятно, так проявляет себя ингибирующее действие меди на электронный транспорт на акцепторной стороне ФСII при многократном повторении измерений ОJ-стадии в микроскопе. В результате

при повторных измерениях ОJ кривых в клетках постепенно накапливаются закрытые РЦ и увеличивается F_o . В контроле при тех же настройках микроскопа закрытые РЦ не накапливаются, так как успевают полностью возвращаться в открытое состояние к следующей насыщающей вспышке света, которая индуцирует ОJ-переход.

Возможно также, что медь ингибирует клеточный митоз, и поэтому содержание пигментов в расчете на клетку увеличивается по сравнению с контролем, где нормальное деление клеток продолжается. Во всяком случае, этот результат (рост F_o и F_{st} на клетку) не является случайным, и заслуживает дальнейшего изучения, так как аналогичное увеличение наблюдали при действии ионов и наночастиц серебра (Тодоренко и др. 2014).

Несмотря на то, что природа увеличения F_o на клетку не вполне ясна, это явление позволяет на микроскопе выявить токсическое действие меди в малых концентрациях, что невозможно при измерениях усредненных сигналов в суспензии (одинаковые F_o^* для контроля и 0,1мкМ меди, рис. 4.2.5А).

Таким образом, наблюдаемое нами увеличение интенсивности флуоресценции одиночных клеток при концентрациях меди 0,1 мкМ может быть связано с тем, что в применяемой нами методики не было достаточной темновой адаптации перед измерением. Отсутствие этого эффекта при концентрации меди 10 мкМ связано с тем, что больший вклад в этом случае вносит нефотохимическое тушение и выцветание хлорофилла (концентрация 10 мкМ рис. 4.2.1).

Наиболее интересным фактом, установленным для концентрации 10мкМ, является то, что клетки в популяции реагируют на присутствие токсиканта неоднородно. Так, на распределении клеток в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} (рис.4.2.8, черные точки) можно наблюдать, как клетки условно разделяются на два кластера – один с высокой интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 500-4000 отн. ед.) и высоким значением фотохимического квантового выхода ФСII (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0,3-0,5, рис.4.2.8

черные точки справа), а второй – с низкой интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 0-100 отн. ед.) и небольшим значением фотохимического квантового выхода ФСII (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0-0,2, рис.4.2.8, черные точки слева).

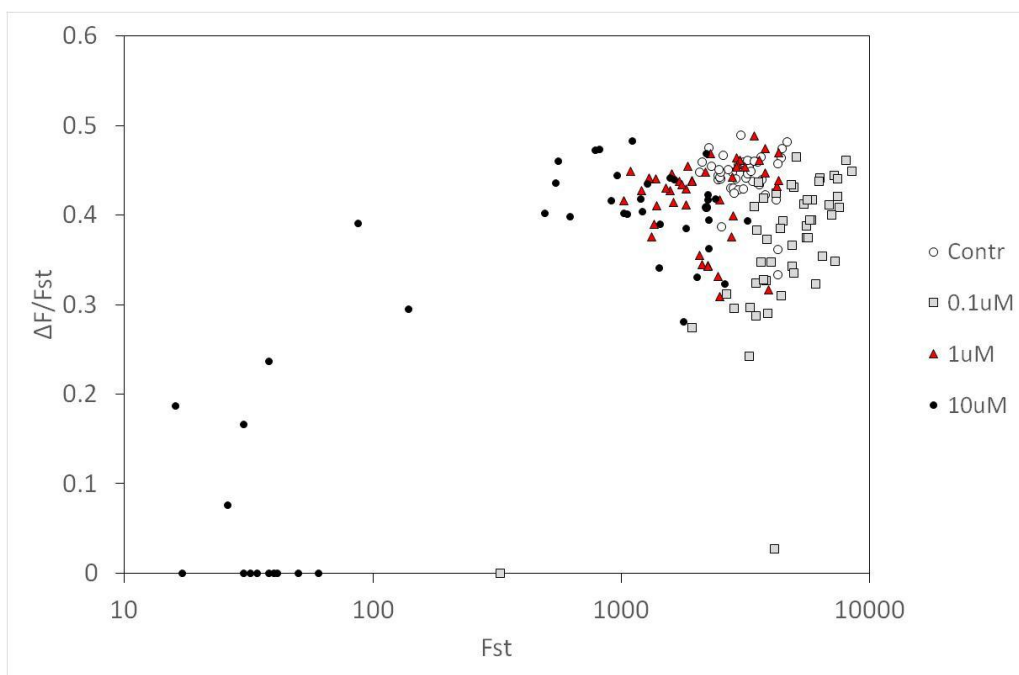


Рис.4.2.8. Соотношения между интенсивностью максимальной флуоресценции клетки (F_{st}) и фотохимическим квантовым выходом ФСII ($\Delta F/F_{st}$) в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди. Максимальная флуоресценция клетки (F_{st}) представлена в логарифмических координатах. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Также, как и для суспензии мы посчитали средние значения фотохимического квантового выхода ФСII для выборки по одиночным клеткам (рис.4.2.9).

В контрольных условиях среднее по клеткам значение фотохимического квантового выхода ФСII (параметр $\Delta F/F_{st}$) составило около 0,44, что заметно меньше, чем значение F_v/F_m (0,72), полученное стандартно

при измерениях в суспензии клеток (рис. 4.2.4, 24ч). Эта разница имеет систематический характер и обусловлена различным состоянием закрытых реакционных центров в тот момент, когда фиксируется максимальная флуоресценция («single turnover state» на микрофлуориметре и «multiple turnover state» на флуаниметре - аквапен).

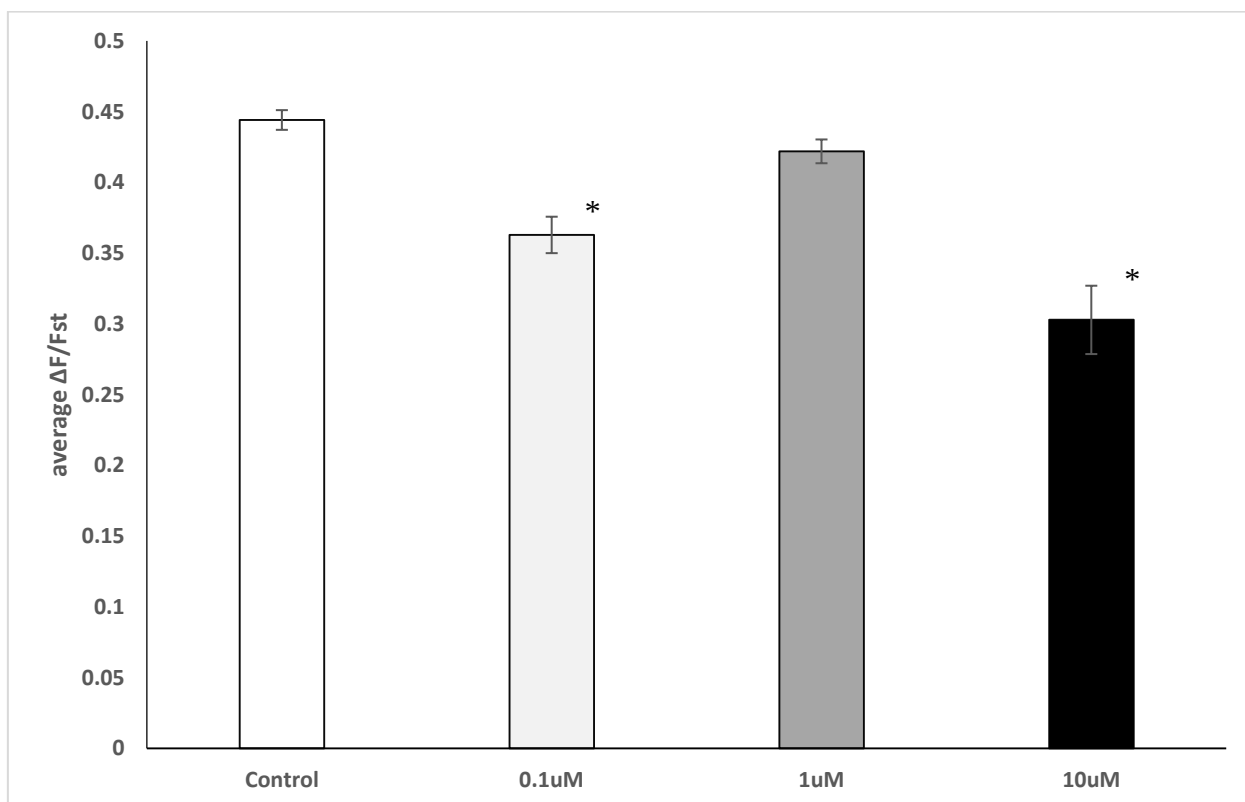


Рис.4.2.9. Значения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью 50 $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

При добавлении меди изменения $\Delta F/F_{st}$ на индивидуальных клетках (рис. 4.2.9) значительно более выражены, чем изменения значений F_v/F_m , полученных стандартно при измерениях в суспензии клеток (рис. 4.2.4, 24ч). Так при концентрации меди 10 мкМ значение $\Delta F/F_{st}$ уменьшалось в полтора раза ниже контрольного (от контрольных 0,44 до 0,3), в то время как значение F_v/F_m уменьшалось лишь на несколько процентов (от контрольных 0,72 до 0,68, рис. 4.2.4).

Изменения в параметрах флуоресценции в ответ на действие металлов в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} видны недостаточно хорошо из-за скученности точек, соответствующих разным клеткам, поэтому для большей наглядности результаты измерений на клетках были представлены в виде гистограмм (рис. 4.2.10).

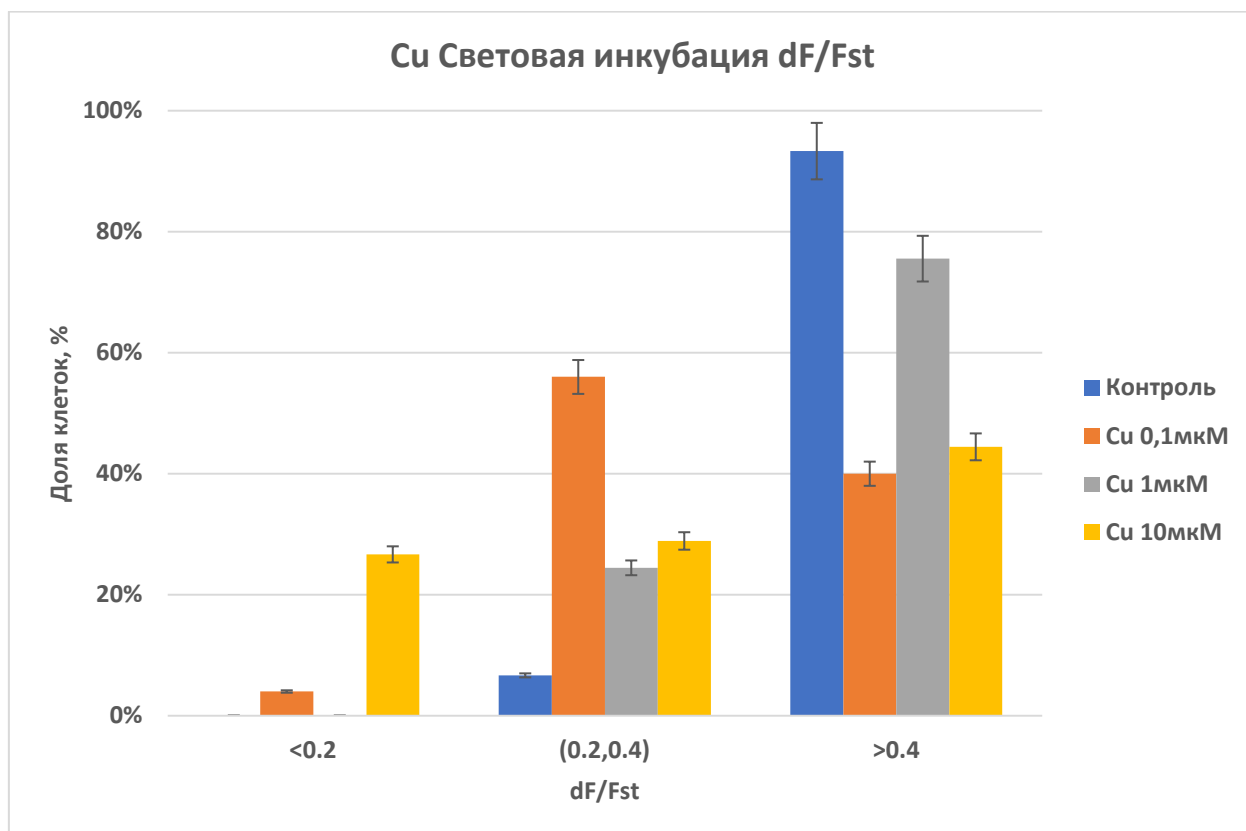


Рис. 4.2.10. Гистограммы распределения одиночных клеток по фотохимической активности ФСII. По оси абсцисс — относительная переменная флуоресценция ($\Delta F/F_{st}$); по оси ординат — доля клеток в %. Инкубация клеток в контроле и с ионами меди до начала измерения проводилась в течение 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

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. 4.2.10. 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 меди распределение клеток смещается в сторону «средней» и «низкой» категории. Даже при гибели значительной части клеток, в популяции тем не менее остаются клетки с высоким значением $\Delta F/F_{st}$. Такая неоднородность реакции может иметь важное экологическое значение, обеспечивая выживание части популяции в стрессовых условиях за счет таких устойчивых к токсикантам клеток.

Таким образом, по данным микрофлуориметрии мы выявили различные аспекты действия меди на популяцию клеток, которые не доступны методу регистрации флуоресценции в суспензии. К таким аспектам относятся:

- увеличение гетерогенности популяции по интенсивности сигналов флуоресценции на одну клетку;
- изменение средних значений интенсивности флуоресценции на клетку (увеличение при малых концентрациях меди и уменьшение при больших концентрациях меди в сравнении с контролем);
- Снижение среднего по клеткам значения относительной переменной флуоресценции ($\Delta F/F_{st}$).

Увеличение гетерогенности популяции по интенсивности флуоресценции при действии меди в концентрации 10 мкМ происходит за счет значительного (10 и более раз) уменьшения интенсивности флуоресценции (и F_o и F_{st}) в некоторых клетках. По всей видимости, ФСА этих клеток оказывается наиболее чувствительным к действию токсиканта, поскольку в этих же клетках мы регистрировали близкие к нулю значения фотохимического квантового выхода ФСII (рис.4.2.8). Из-за того, что такие клетки светятся до 10 раз менее интенсивно, они хорошо выделяются среди других клеток по данным микрофлуориметрии, однако они практически не влияют на результаты измерений F_v/F_m в суспензии на приборе AquaPen.

4.2.4. Действие меди на пигментный состав в культуре микроводоросли *S. quadricauda* при инкубации в темноте

Подобный подход, описанный выше в разделе при изучении действия меди на клетки микроводоросли *S. quadricauda* при световой инкубации мы применили и в случае темновой инкубации образцов.

Результаты по спектрам поглощения

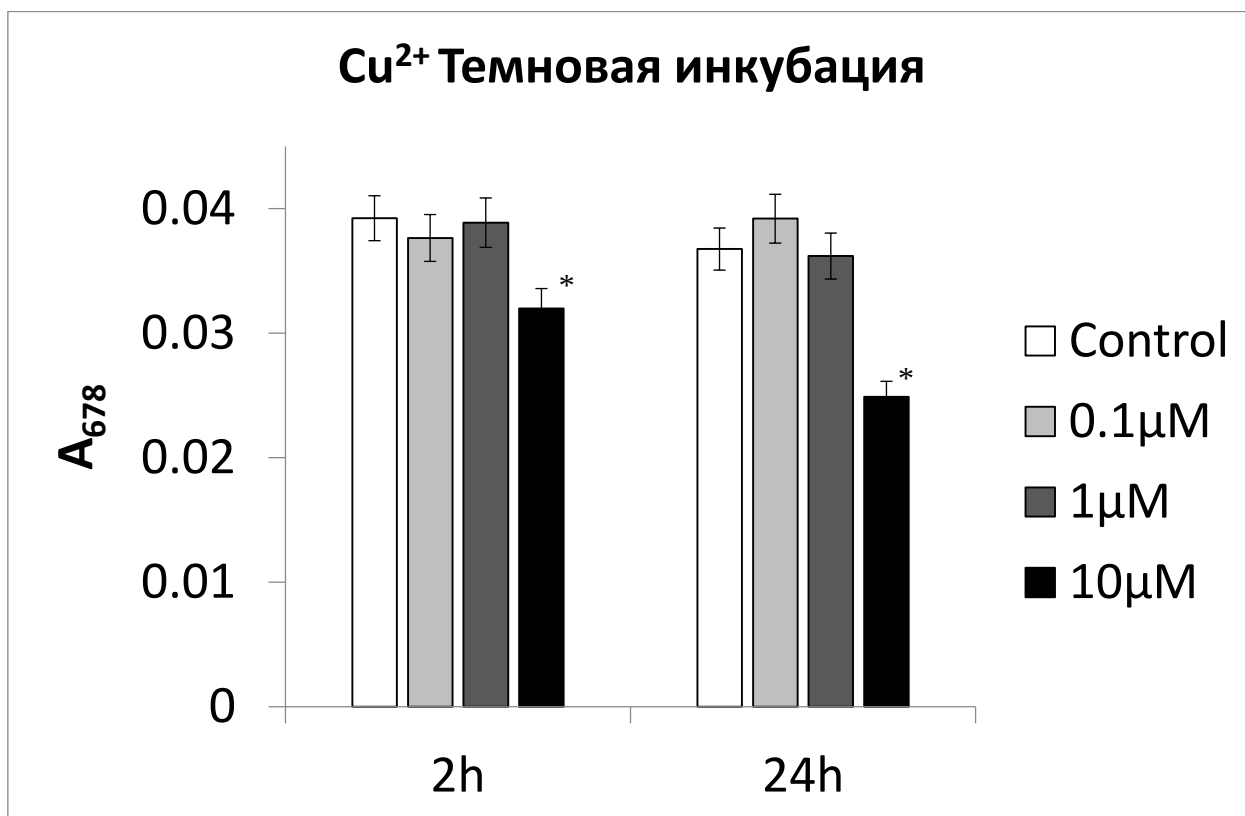


Рис. 4.2.11. Изменение оптической плотности в полосе поглощения хлорофилла «а» ($\lambda_{\text{max}}=678$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Как видно из рисунка 4.2.11, за 24 часа в закрытом флаконе в контрольных условиях достоверных изменений по содержанию хлорофилла не выявлено. Оптическая плотность в образцах в темновых условиях инкубации с содержанием меди 0,1 и 1 мкМ также сохраняется на уровне близком к контрольному – 0,04, который был задан при начальном разведении маточной культуры во время ее пересадки в экспериментальные пробирки. Действие меди в концентрации 10 мкМ сопровождается уменьшением оптической плотности: почти на четверть через первые 2 часа и на 40% через сутки инкубации (рис. 4.2.11). То есть по средним значениям повреждение хлорофилла было менее выражено, чем в таком же образце при инкубации 24 в световых условиях (рис. 4.2.1.).

Тем не менее, разницу между световой и темновой инкубацией по этим данным не удалось подтвердить статистически, что не позволяет однозначно утверждать о наличии фотодинамических процессов повреждения фотосинтетического аппарата водорослей при действии ионов меди.

Поглощение каротиноидов при темновых условиях также, как и при световых, почти не изменяется во времени инкубации при концентрациях меди 0, 0,1 и 1мкМ, но постепенно уменьшается при действии меди в концентрации 10 мкМ (рис. 4.2.12).

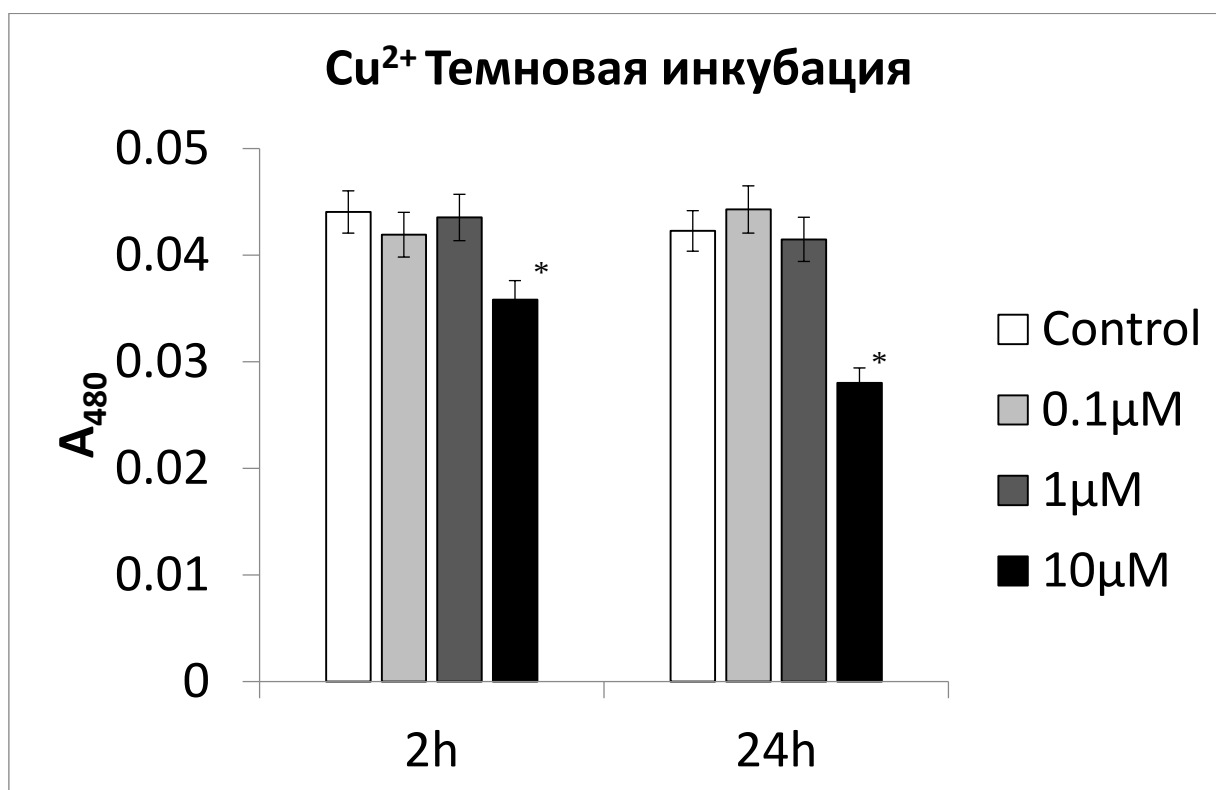


Рис. 4.2.12. Изменение оптической плотности в полосе поглощения каротиноидов ($\lambda_{\text{max}}=480$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Отношение поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов через 2 и 24 часа инкубации практически не изменяется при всех концентрациях меди (рис. 4.2.13).

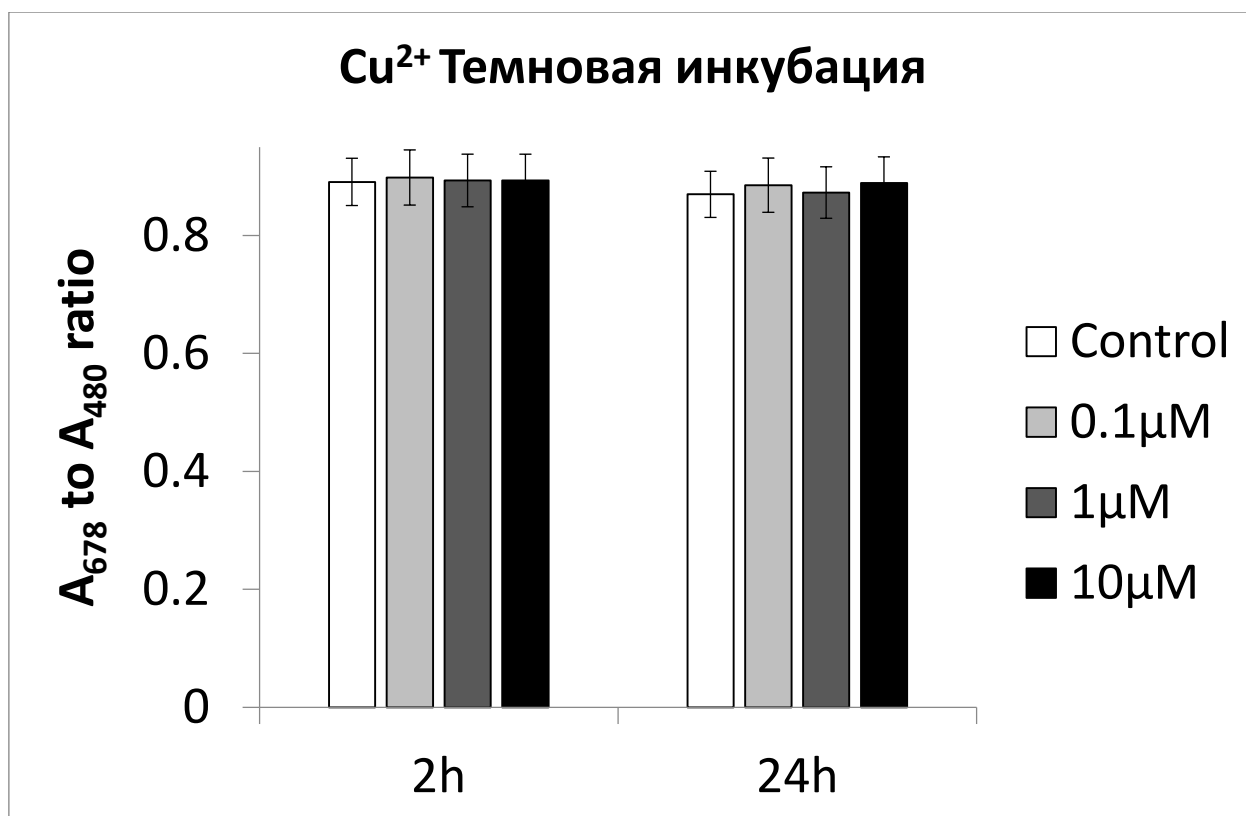


Рис. 4.2.13. Изменение интенсивности поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения.

4.2.5. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток *S. quadricauda* при их инкубации в темновых условиях

Также, как и при инкубации клеток в условиях освещения с медью при разных концентрациях (рис.4.2.4), инкубация клеток в темновых условиях с медью в тех же концентрациях не приводила к достоверному изменению относительной переменной флуоресценции хлорофилла по сравнению с контролем (рис. 4.2.14).

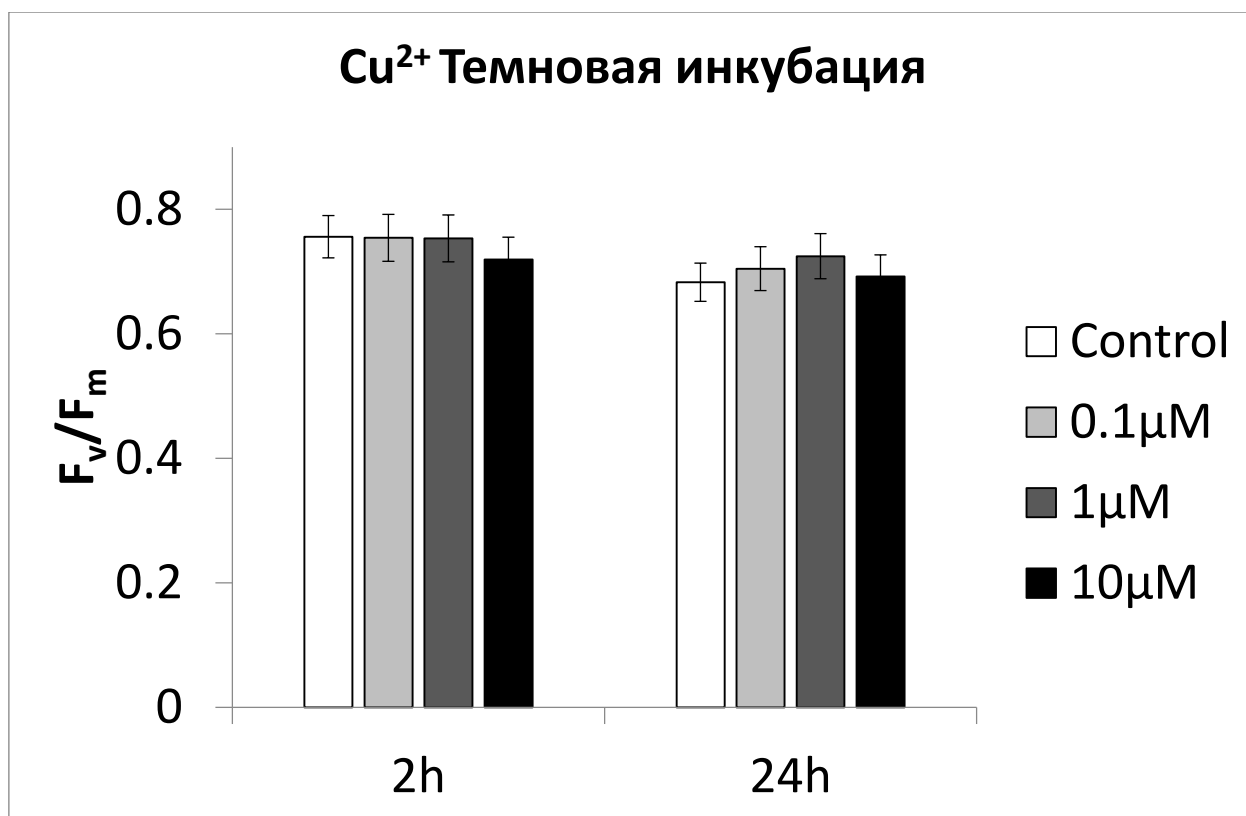


Рис. 4.2.14. Изменение относительной переменной флуоресценции хлорофилла культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения.

В контрольных условиях при инкубации в темноте, как и в случае инкубации в условиях освещения (рис.4.2.5А), удельное значение интенсивности минимальной флуоресценции в расчете на единицу поглощенной световой энергии (F^*_o) изменяется несущественно (рис. 4.2.15А, 2ч и 24ч контроль).

При действии меди в темноте в концентрации 10мкМ значение F^*_o уменьшалось, причем это снижение прогрессировало со временем инкубации (рис. 4.2.15А, 24ч против 2ч, 10мкМ). Такое снижение может указывать на усиление тушения возбужденных молекул хлорофилла по нефотохимическому пути.

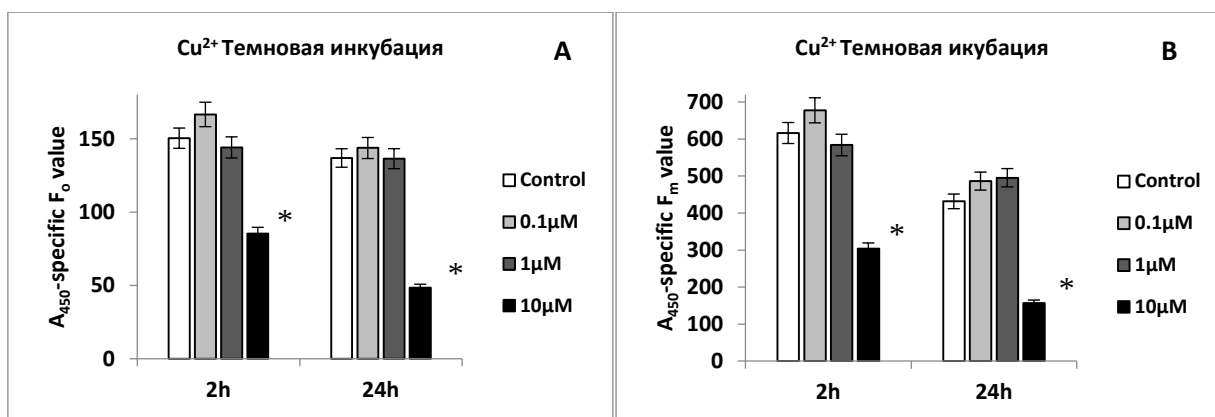


Рис. 4.2.15. Изменение удельных значений минимальной (А) и максимальной флуоресценции (В) (в расчете на единицу поглощенной световой энергии) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с медью. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Напомним, что при действии меди на свету мы наблюдали тенденцию к частичному восстановлению F_o^* по окончании первых суток в сравнении с 2ч инкубацией (рис. 4.2.5А, 24ч против 2ч, 10мкМ). Это говорит о том, что та интенсивность света, которую мы выбрали для проведения световой инкубации ($50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), не оказывает повреждающего действия на фотосинтетический аппарат клеток. Действие меди нарушает, помимо фотосинтеза, другие процессы в клетках. И в таких условиях фотосинтез, который протекает на свету, стимулирует процессы репарации клеток. При инкубации клеток в темноте фотосинтез отключается, в результате чего замедляется репарация клеток, и токсичное действие меди на клеточные структуры и метаболизм усиливается.

В концентрациях 0.1 и 1 мкМ медь не оказывала достоверного влияния на показатель F_o^* (рис. 4.2.15А). При этом при концентрации 10 мкМ, медь вызывает уменьшение величины параметра F_o^* по сравнению с контролем, которое имеет более выраженный характер при увеличении времени инкубации до 24 часов. При оценке параметра F_m^* при темновой инкубации клеток видно, что он уменьшается в контроле при увеличении времени инкубации клеток от 2 до 24 часов (рис. 4.2.15В). В концентрациях 0,1 и 1

мкМ медь не оказывает значительного достоверного изменения данного параметра по сравнению с контролем, также, как и в случае световой инкубации (рис. 4.2.5В). При концентрации 10 мкМ наблюдается достоверное снижение этого параметра по сравнению с контролем на 50% через 2 часа инкубации и на 65% через 24 часа инкубации (рис. 4.2.15В).

4.2.6. Влияние меди на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках *S. quadricauda* при их инкубации в темновых условиях

Аналогичный подход, описанный выше (рис.4.2.6) мы использовали для измерения флуоресценции на одиночных клетках при их темновой инкубации 24 часа при действии меди и без нее (контроль). Из рисунка 4.2.16 видно, что клетки в популяции сильно отличаются друг от друга по интенсивности сигналов флуоресценции как в контроле, так и при действии меди во всех концентрациях.

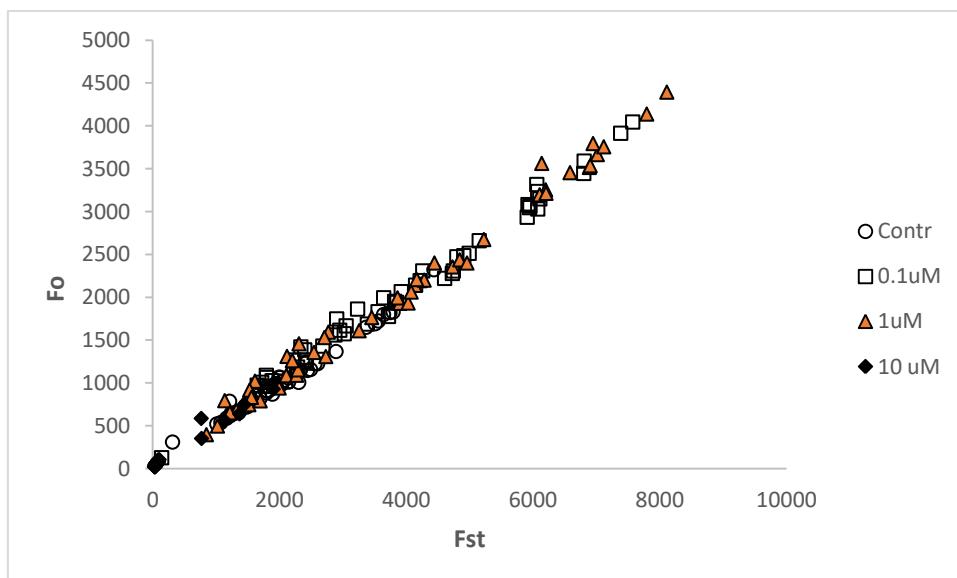


Рис. 4.2.16. Соотношения между интенсивностью максимальной (F_{st}) и интенсивностью минимальной (F_o) флуоресценции клетки в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии ионов меди. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света.

Также, как и в случае световой инкубации, нами были рассчитаны средние на клетку значения F_0 и F_{st} по данным FRR-микрофлуориметрии для случая 24-х часовой темновой инкубации (рис. 4.2.17). Также, как и в случае световой инкубации, в опыте с медью показатели индивидуальных клеток изменяются гораздо сильнее, чем те же показатели в расчете на единицу поглощенной энергии (в суспензии). Это подчеркивает преимущество примененного нами более чувствительного метода исследования – флуориметрии, показывающую гетерогенность клеток в популяции.

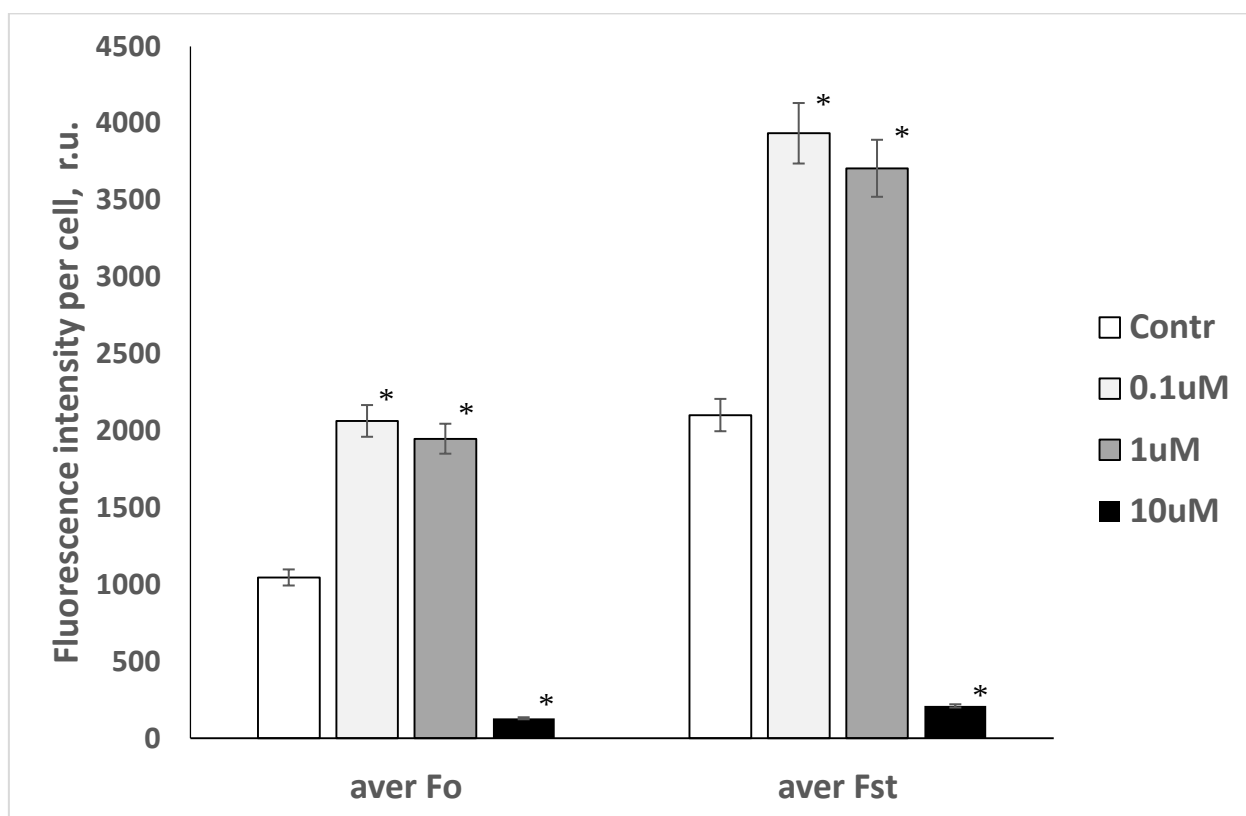


Рис. 4.2.17. Средние значения минимальной (F_0) и максимальной (F_{st}) флуоресценции на одну клетку культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди. До начала измерения проводилась 24 ч инкубация клеток в отсутствии света. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Как и в случае световой инкубации (рис. 4.2.7) удельные значения F_0 и F_{st} в зависимости от концентрации меди изменялись немонотонно. В концентрациях 0,1 и 1 мкМ было зафиксировано почти одинаковое увеличение F_0 и F_{st} по сравнению с контролем, а при большей концентрации

(10 мкМ) уменьшение удельных параметров почти в 10 раз относительно контроля (рис. 4.2.17), что было более выражено по сравнению со случаем световой инкубации (рис. 4.2.7).

Также, как и в случае световой инкубации, наблюдаемое нами увеличение интенсивности флуоресценции одиночных клеток при концентрациях меди 0,1 мкМ может быть связано с тем, что в применяемой нами методике (повторные измерения ОЖ-кинетики быстрой флуоресценции для достижения приемлемого отношения сигнал/шум) при ингибировании электронного транспорта медью наблюдается накопление закрытых РЦ ФСII. Такой же эффект наблюдается и при концентрации меди 1 мкМ.

При действии меди в концентрации 10 мкМ, также, как и в случае световой инкубации (рис. 4.2.7), наблюдали многократное уменьшение интенсивности минимальной и максимальной флуоресценции на клетку по сравнению с контролем (рис. 4.2.17). Это может быть связано с уменьшением содержания хлорофилла на клетку и дополнительно большим вкладом нефотохимического тушения. Наличие тушителей возбужденного хлорофилла (зеаксантина или катион-радикала P680, который накапливается при инактивации кислород-выделяющего комплекса) может быть выявлено по кинетикам затухания флуоресценции в пикосекундном диапазоне. Данные по этим измерениям будут представлены ниже.

Также, как и при инкубации в световых условиях (рис. 4.2.8) установлена гетерогенность распределении клеток в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} и для темновых условий инкубации особенно выраженная для концентрации меди в среде инкубации - 10 мкМ (рис. 4.2.18, черные точки), которая указывает на неоднородную реакцию клеток в популяции на присутствие токсиканта в данной концентрации.

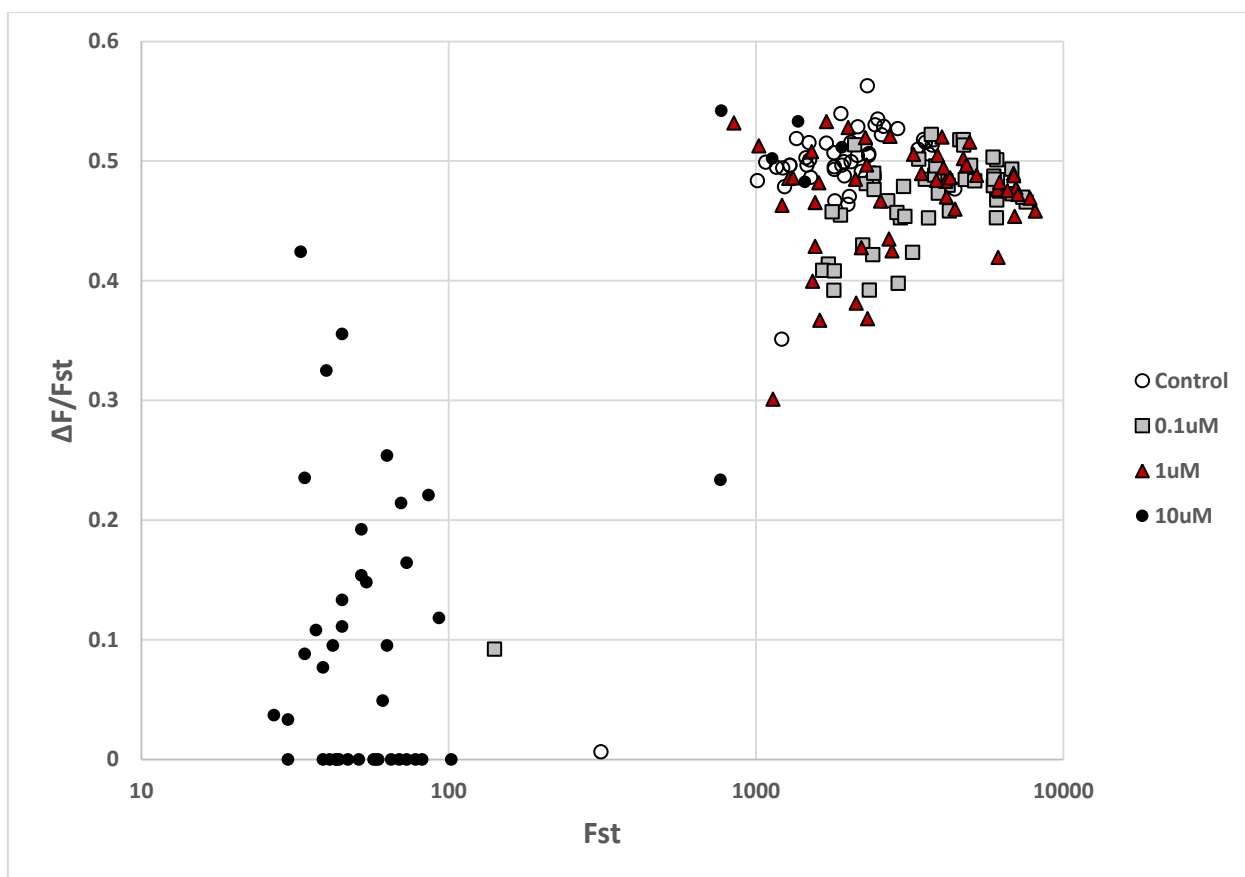


Рис. 4.2.18. Соотношения между интенсивностью максимальной флуоресценции клетки (F_{st}) и фотохимическим квантовым выходом ФСП ($\Delta F/F_{st}$) в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди. Максимальная флуоресценция клетки (F_{st}) представлена в логарифмических координатах. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света.

Также как и в случае световой инкубации на распределении клеток в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} (рис. 4.2.8, черные точки), при темновой инкубации можно наблюдать, распределение клеток на две условных субпопуляции – одна с более высокой интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 800-2000 отн. ед.) и значением фотохимического квантового выхода ФСП (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0,23-0,54, рис. 4.2.18, черные точки справа), а вторая – с низкой интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 0-100 отн. ед.) и значением фотохимического квантового выхода ФСП (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0-0,42, рис. 4.2.18 черные точки слева). В сравнении с инкубацией на свету (рис. 4.2.8 и рис. 4.2.18) здесь большее количество клеток находится в субпопуляции с меньшей интенсивностью флуоресценции.

Также, как и в случае со световой инкубацией (рис.4.2.9.) мы построили зависимость среднего значения фотохимического квантового выхода ФСII (параметр $\Delta F/F_{st}$) по одиночным клеткам в темновых условиях инкубации (рис.4.2.19).

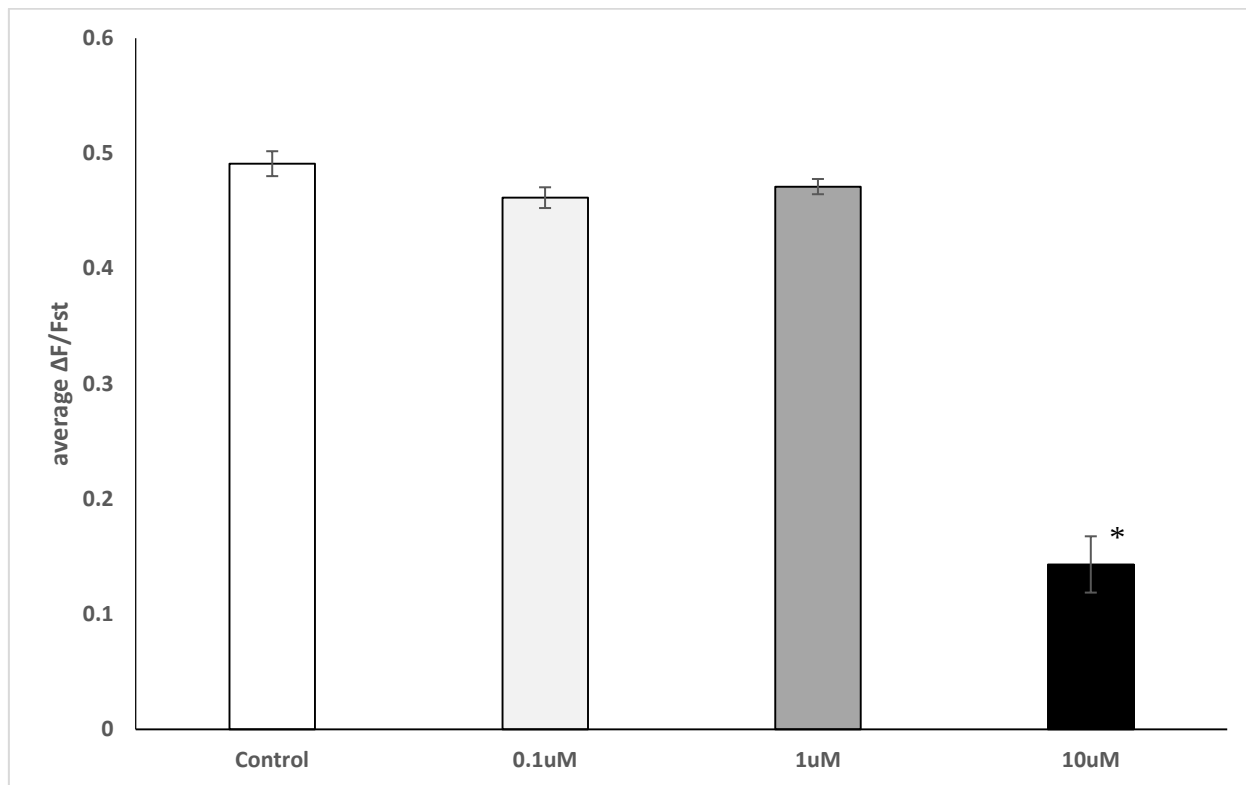


Рис. 4.2.19. Значения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии меди. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

В контрольных условиях среднее по клеткам значение фотохимического квантового выхода ФСII (параметр $\Delta F/F_{st}$) в темновых условиях составляет около 0,5 (рис. 4.2.19), что заметно меньше, чем значение F_v/F_m (около 0,7), полученное стандартно при измерениях в суспензии клеток в темновых условиях (Рис. 4.2.14, 24ч). Эта разница имеет систематический характер и обусловлена различным состоянием закрытых реакционных центров в тот момент, когда фиксируется максимальная флуоресценция (single turnover state vs multiple turnover state).

Также, как и в случае со световыми условиями инкубации (рис. 4.2.10) для большей наглядности результаты измерений на одиночных клетках при темновой инкубации были представлены в виде гистограмм распределения клеток по параметру - $\Delta F/F_{st}$ (рис. 4.2.20).

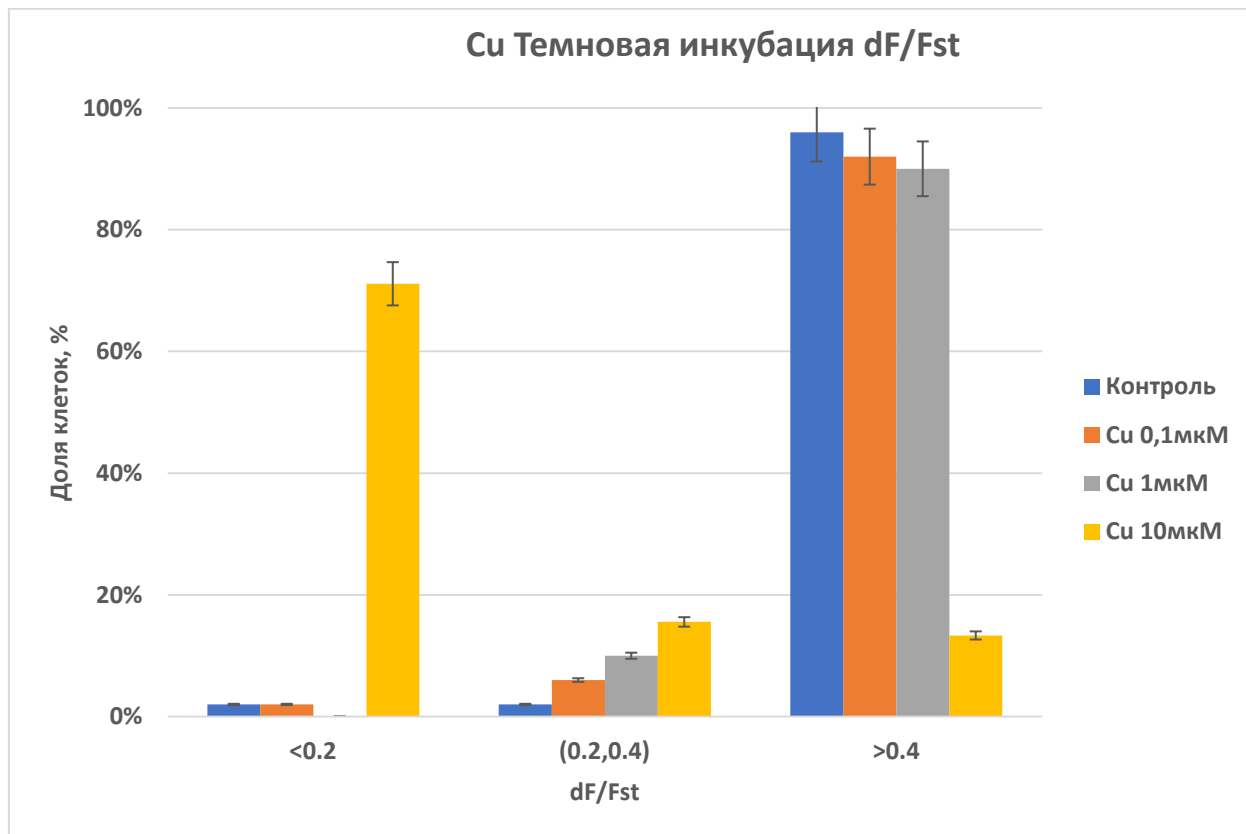


Рис. 4.2.20. Гистограммы распределения одиночных клеток по фотохимической активности ФСII. По оси абсцисс — относительная переменная флуоресценция ($\Delta F/F_{st}$); по оси ординат — доля клеток в %. Инкубация клеток в контроле и с ионами меди до начала измерения проводилась в течение 24 ч при отсутствии освещения.

Также весь диапазон измеренных значений $\Delta F/F_{st}$ был распределен на три области: область низких ($0 - 0.2$), средних ($0.2-0.4$) и высоких (>0.4) значений. В контрольных условиях в популяции около 90% клеток соответствует категории высокой активности ФСII. С увеличением концентрации меди распределение клеток смещается в сторону «средней» и «низкой» категории. При наибольшей концентрации меди в темновых условиях около 70% клеток попадает в область низкой активности ФСII.

Данные также показывают неоднородность реакции клеток при темновых условиях которая не выявлялась при измерениях на суспензиях клеток, указывающее на более перспективное применение микрофлуориметрического анализа одиночных клеток для экологического мониторинга для оценки токсичности поллютантов.

4.2.7. Особенности действия меди на индукцию быстрой флуоресценции в клетках культуры микроводоросли *S. quadricauda*. ОЖР-кривые и их параметры

В этом разделе исследовано влияние ионов меди в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течении 2 и 24 часов инкубации при непрерывном освещении и в темноте на индукцию быстрой флуоресценции культуры микроводоросли *S. quadricauda* по сравнению с таковой в контроле (концентрация меди - 0). Наиболее выраженный эффект наблюдался при действии максимальной концентрации меди в течение 24 часов (рис. 4.2.21).

На рис. 4.2.21 представлены индукционные кривые флуоресценции Хл а микроводоросли *S. quadricauda* после воздействия соли меди в различных концентрациях, измеренные после 5-ти минутной темновой адаптации (перед каждым измерением). В кривой индукции флуоресценции Хл а выделяют несколько фаз, известных как О-Ж-И-Р переходы, отражающие последовательное восстановление переносчиков электронов в ЭТЦ, главным образом, в ФСII. Начальный уровень флуоресценции при 50 мкс (уровень О) соответствует интенсивности при «открытых» РЦ, когда хинонный акцептор Q_A находится в окисленном состоянии. Участок О-Ж обусловлен светоиндуцированным восстановлением Q_A , а последующая фаза Ж-И-Р отражает дальнейшее накопление восстановленного Q_A в результате восстановления акцепторов Q_B и пула пластохинонов (РQ), а также конечных акцепторов в ФСI. При ~200 мс индукционная кривая достигает своего максимума, при котором РЦ переходят в «закрытое» состояние с восстановленным Q_A . Как видно из представленного рисунка 4.2.21 А, В, после инкубации культуры с $CuSO_4$ выявлены изменения в форме ОЖР-кривых. Так, в наибольшей концентрации 10 мкМ обнаружено уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем как световых, так и в темновых условиях инкубации.

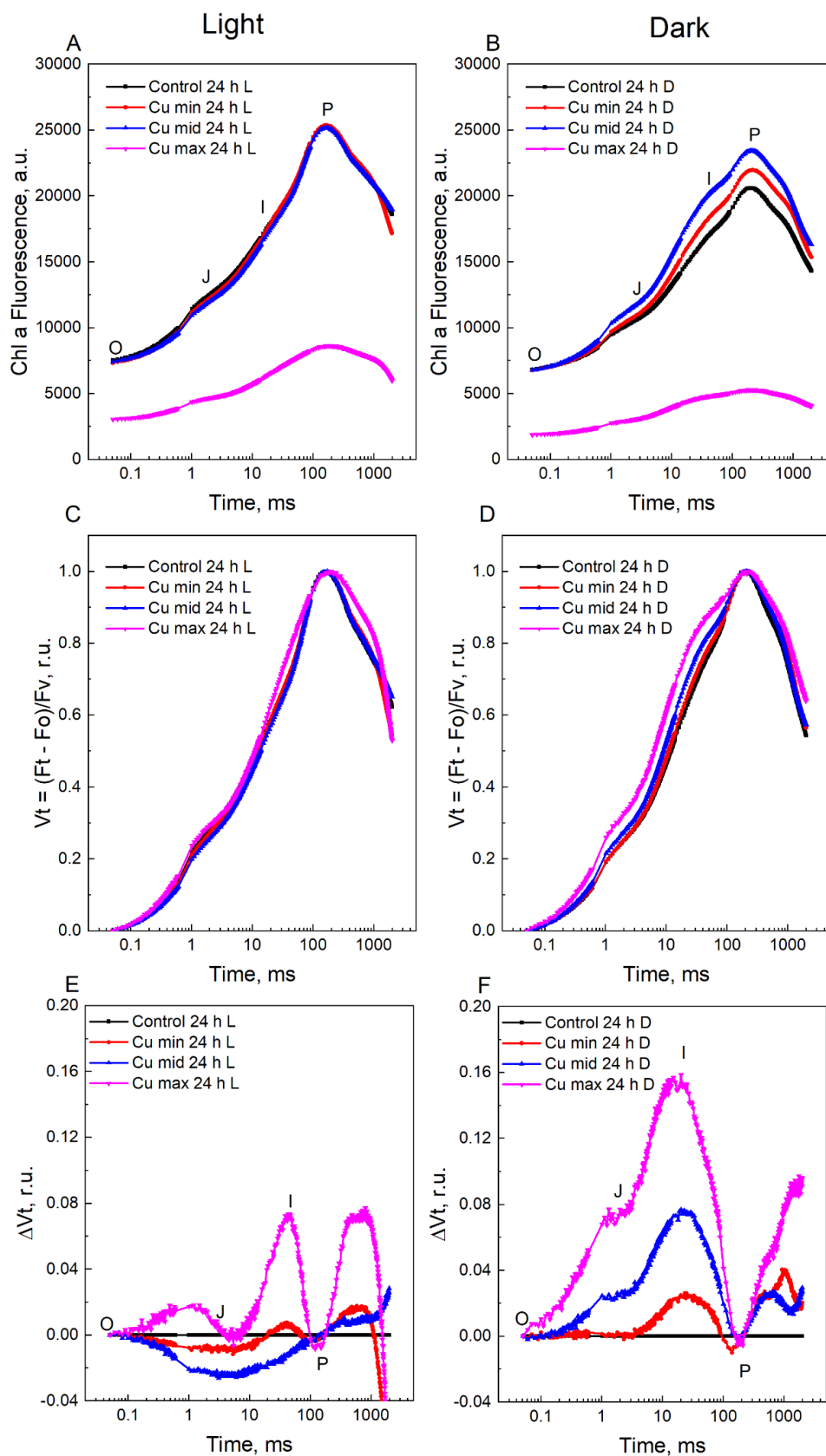


Рис. 4.2.21. Индукционные кривые флуоресценции Хл а культуры микроводоросли *S. quadricauda* после 24 ч воздействия CuSO_4 в

концентрациях 0 (контроль), 0.1, 1 и 10 мкМоль/л в световых условиях при $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A, C, E) и при выключенном свете (B, D, F). Не нормированные ОЖР-кривые (A, B), ОЖР-кривые нормированы на начальную (при 50 мкс) и максимальную интенсивности флуоресценции и представлены в виде $V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$ (C, D) и разности значений функций $\Delta V_t = (V_t(\text{медь}) - V_t(\text{контроль}))$ (E, F).

При воздействии средней концентрации 1 мкМ и самой низкой концентрации 0,1 мкМ не выявлено изменений в форме кривой по сравнению с контролем при непрерывном освещении. Тогда как, в темновых условиях средняя и низкая концентрация меди вызывала изменения в форме кривых по сравнению с контролем, указывающие на нарушение в ЭТЦ при действии этих концентраций.

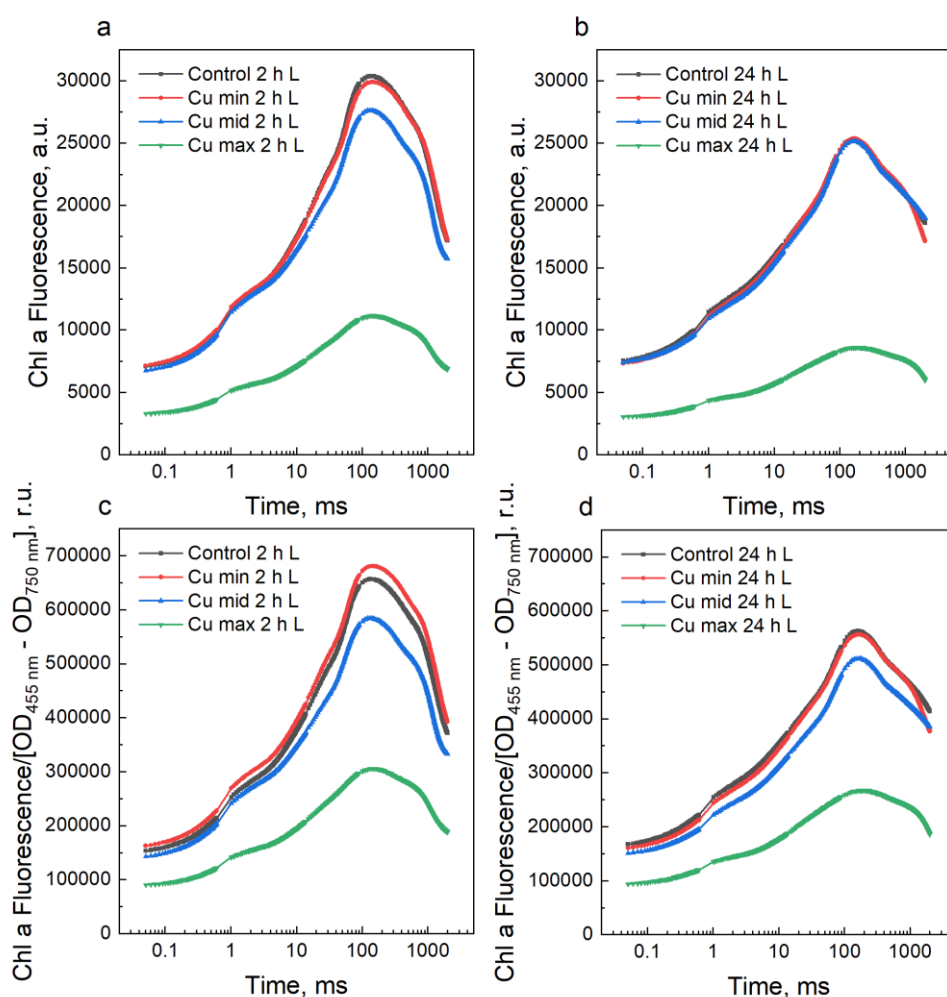


Рис. 4.2.22. Индукционные кривые флуоресценции Хл а (a, b) культуры микроводоросли *S. quadricauda* после 2 (a, b) и 24 (c, d) ч воздействия CuSO_4

в концентрациях 0 (контроль), 0,1, 1 и 10 мкМоль/л. с, d – кривые ОЖР нормированы на оптическую плотность (A455 nm – OD750 nm). Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью 50 мкмоль·м⁻²·с⁻¹.

Отсутствие этого эффекта при световых условиях инкубации может указывать на активизацию репарационных процессов в этих условиях, на что мы указывали и в предыдущих разделах работы.

Для того, чтобы исключить влияние уменьшения содержания хлорофилла в образцах при воздействии меди, индукционные кривые нормировали на оптическую плотность (OD455 nm – OD750 nm) (рис. 4.2.22.).

Форма индукционных кривых после нормирования на оптическую плотность существенно не изменилась, что свидетельствует о незначительном снижении содержания хлорофилла при воздействии меди.

Изменения в отдельных фазах индукционных кривых были выявлены после нормирования на начальный уровень флуоресценции при 50 мкс (уровень O) (рис. 4.2.23).

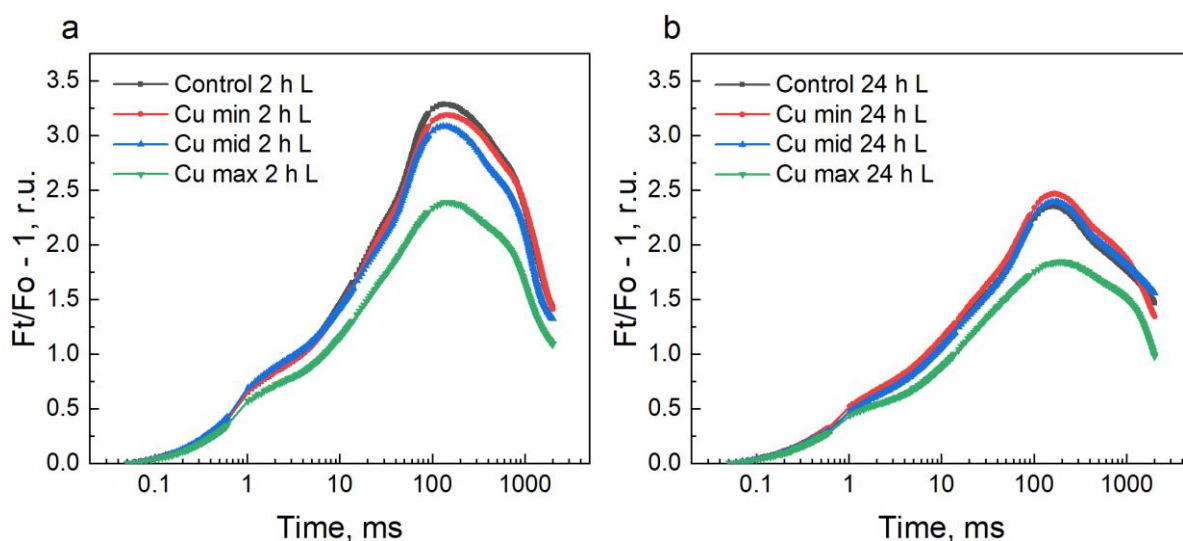


Рис. 4.2.23. Индукционные кривые флуоресценции Хл а культуры микроводоросли *S. quadricauda* после 2 (a) и 24 (b) ч воздействия CuSO₄ в концентрациях 0 (контроль), 0,1, 1 и 10 мкМоль/л. ОЖР-кривые нормированы на интенсивность флуоресценции при 50 мкс и представлены в виде Ft/Fo – 1. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью 50 мкмоль·м⁻²·с⁻¹.

Так, при воздействии меди в высокой концентрации (10 мкМ) выявлено снижение уровней флуоресценции J, I, и P по сравнению с контролем. Тушение флуоресценции во время фазы J-I-P может свидетельствовать об ингибировании электронного транспорта на донорной стороне ФСII и, как следствие, накопления P680+, который значительно тушит флуоресценцию хлорофилла (Govindjee, 1995). Снижение фазы J-I-P ранее наблюдали при воздействии меди у других видов сценедесмуса *Scenedesmus obliquus* (Dewez et al., 2012), *Scenedesmus incrassatulus* (Perales-Vela et al., 2007) и у хлореллы *Chlorella vulgaris* (Oukarroum et al., 2012).

Для того, чтобы исключить влияние начального (F_o) и максимального (F_m) уровней флуоресценции, индукционные кривые нормировали на эти уровни и были представлены в виде относительной переменной флуоресценции (F_v) в момент времени t : $V_t = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$ (рис. 4.2.21 C, D). Это экспериментальное выражение принято в качестве меры доли Q_A , находящегося в восстановленном состоянии [$Q_A^-/Q_{A(\text{total})}$], и позволяет рассматривать только динамическое накопление Q_A^- в разных образцах (Haldimann and Strasser, 1999).

Некоторое изменение в V_t после световой инкубации с CuSO_4 (10 мкМ) выявлены на уровне I (V_I при 30 мс, рис.4.2.21 C). Тогда как, после темновой инкубации с медью (10 мкМ) выявлен рост не только на уровне I, но на уровне J (V_J при 2 мс, рис.4.2.21 D). Увеличение V_J связано с нарушением электронного транспорта между Q_A и Q_B , и, следовательно, накоплением Q_B^- невосстанавливающих центров, не способных к реокислению Q_A^- и восстановлению пула хинонов. Начальный наклон относительной переменной флуоресценции (M_0), измеренный между 50 и 300 мкс, увеличивался при воздействии высоких концентраций меди, отражающий увеличение скорости закрывания РЦ в результате ограничения электронного транспорта между Q_A и Q_B .

Для лучшей визуализации изменений в V_t индукционные кривые были представлены в виде разности значений функций $\Delta V_t = (V_t(\text{медь}) -$

V_t (контроль)) (рис.4.2.21 E, F). После 24-х часовой инкубации обнаружено увеличение ΔJ . Наличие ΔJ связано с накоплением Q_A^- , т.е. со снижением скорости Q_A^- реокисления (Kalaji et al., 2014).

При воздействии средних и высоких концентраций меди отмечалось увеличение ΔI , максимальный рост которого наблюдался после 24-х часовой инкубации при максимальной концентрации меди - 10 мкМ. Наличие ΔI может свидетельствовать о снижении восстановления пула PQ. Кроме того, инактивация ферредоксин-НАДФ редуктазы (ФНР) также была предложена как фактор, способствующий появлению ΔI (Schansker et al., 2003). Повышенный уровень I также отражает замедленный электронный транспорт на акцепторы ФCI (Tsimilli Michael and Strasser, 2008).

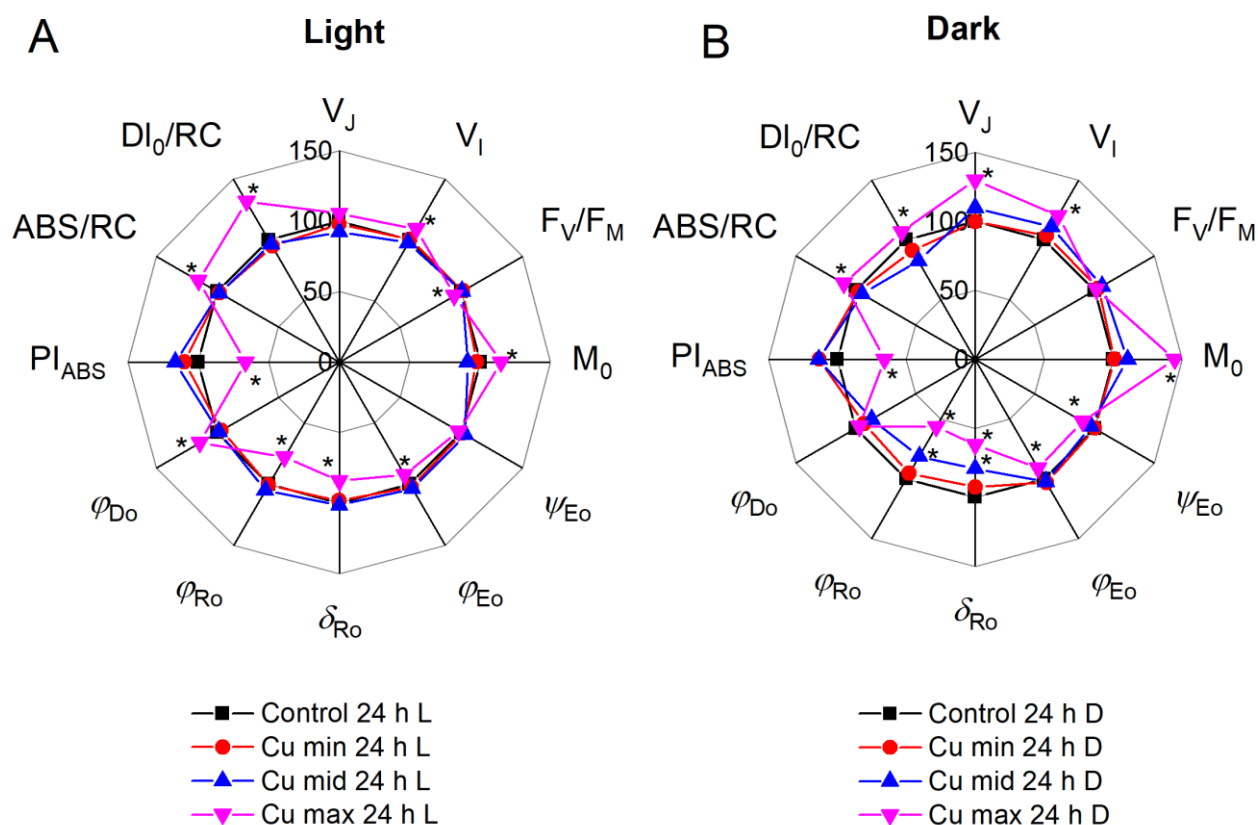


Рис. 4.2.24 Параметры флуоресценции JIP-теста, представлены в виде процента от контроля, где контроль = 100 %. *S. quadricauda* после 24-х часовой инкубации с медью в концентрациях 0 (контроль), 0,1, 1 и 10 мкМоль/л в световых условиях при $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) и при выключенном свете (B). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Для того, чтобы количественно оценить изменения в индукционных кривых флуоресценции хлорофилла мы использовали JIP-тест. На рисунке 4.2.24 представлены параметры флуоресценции, полученные после анализа OJIP-кривых.

Параметр $\psi_{Eo} (1-V_j)$ отражает вероятность транспорта электронов за пределы Q_A^- . Значимые изменения в данном параметре выявлены при воздействии высокой концентрации меди в темновых условиях, что согласуется с данными V_j и M_0 , представленными выше. Уменьшение параметра $\phi_{Eo} (\psi_{Eo} * Fv/Fm)$, характеризующего квантовый выход электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII, было обнаружено при световых и темновых условиях инкубации. Однако снижение ϕ_{Eo} при световых условиях связано, главным образом, за счет значимого снижения Fv/Fm , а в случае с темновыми условиями с параметром ψ_{Eo} . Снижение электронного транспорта на уровне пула PQ и далее к акцепторам ФСI было выявлено в значительной степени у культур, инкубированных с медью в темновых условиях по сравнению со световыми условиями по изменению параметров $\delta_{Ro} ((1 - V_i)/(1 - V_j))$ и $\phi_{Ro} (\psi_{Eo} * Fv/Fm * \delta_{Ro})$.

При воздействии меди в высокой концентрации при световых и темновых условиях выявлено уменьшение доли активных РЦ (увеличение ABS/RC). Для того, чтобы снизить фотоокислительное повреждение РЦ при данных условиях, избыток энергии возбуждения снижался за счет процессов тепловой диссипации, что было показано по изменению параметров Dl_0/RC и ϕ_{Do} . Так, при воздействии меди выявлено увеличение квантовой эффективности диссипации поглощенной энергии (ϕ_{Do}) и рассеяния поглощенной энергии в тепло на активный РЦ (Dl_0/RC). Причем более показательное изменение данных параметров отмечалось у проб в световых условиях.

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

Полученные данные с помощью быстрых индукционных кривых флуоресценции хлорофилла согласовывались с данными быстрых световых кривых флуоресценции хлорофилла, полученных с помощью РАМ-флуориметра. На рис. 4.2.25 представлены световые кривые линейного электронного транспорта и нефотохимического тушения.

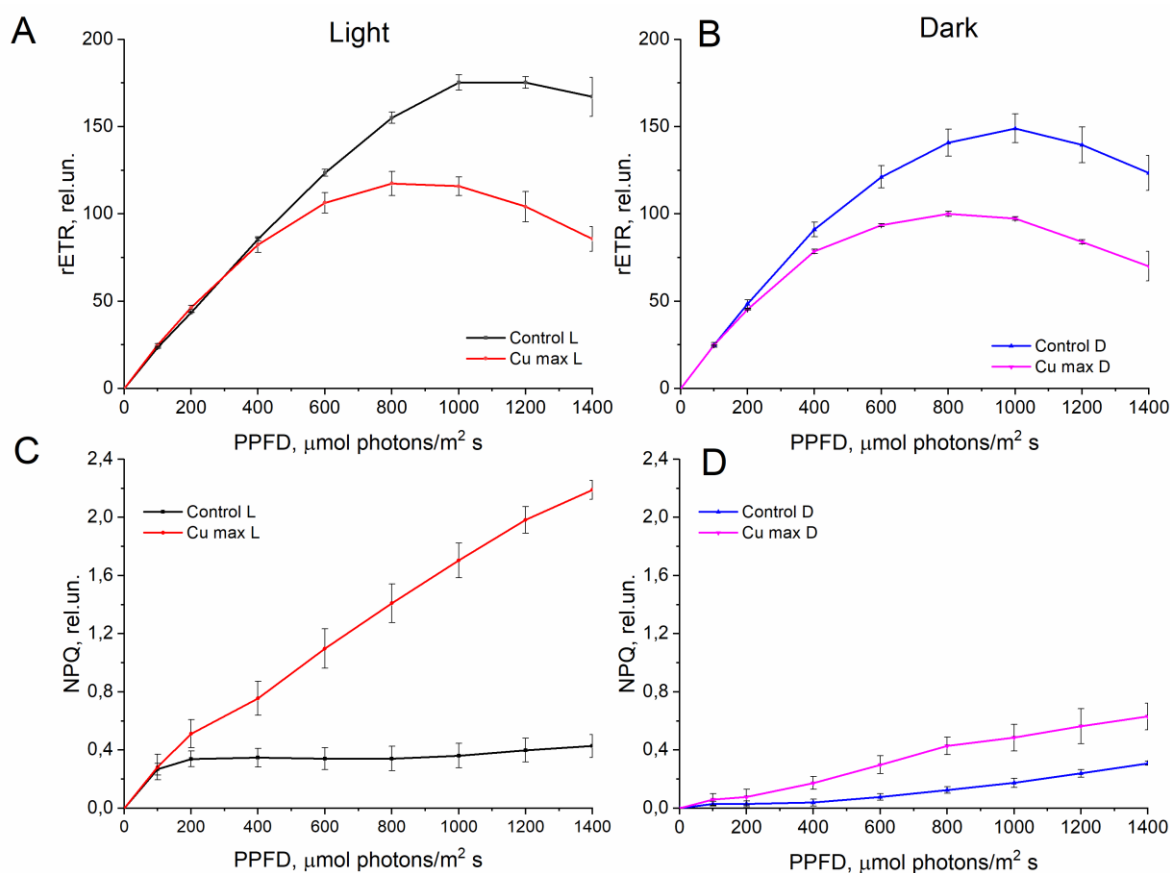


Рис. 4.2.25. Быстрые световые кривые относительного линейного электронного транспорта (rETR) (A, B) и нефотохимического тушения (NPQ) (C, D) *S. quadricauda* после 24-х часовой инкубации с медью в концентрации 10 мкМ в световых условиях при $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A, C) и при выключенном свете (B, D).

Как видно из представленного рисунка, ионы меди оказывали неблагоприятное воздействие на скорость нециклического электронного транспорта, что проявлялось в уменьшении максимальной скорости rETR.

Кроме того, в контроле в световых условиях наблюдался практически линейный рост кривой в промежутке от 0 – 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, а при воздействии меди он был снижен в два раза (0 – 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), что свидетельствует об ограничении электронного потока при воздействии токсиканта. Тогда как, в темновых условиях светолимитированный участок в контроле составил 0 – 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, а при воздействии меди был снижен до 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. В присутствии меди отмечался рост нефотохимического тушения (NPQ) по сравнению с контролем. Значительное увеличение NPQ отмечалось у проб в световых условиях, что свидетельствует об активации защитного механизма (виолаксантиновый цикл) против фотоингибирования на свету (рис. 4.2.25 C). Тогда как, в темновых условиях разница в значениях NPQ для контроля и пробы с медью не была столь большой рис. (4.2.25 D), в связи с тем, что в отсутствии света не происходит значительной генерации АФК.

4.2.9. Влияние меди на параметры кривых затухания флуоресценции в пико- и наносекундном диапазоне в суспензии клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda*

Здесь мы приводим только результаты для меди в концентрации 10мкМ, так как по предварительным измерениям (данные не представлены) эффекты более низких концентраций были пренебрежимо малыми, а полноценное измерение сигналов с математической и статистической обработкой потребовало бы значительного времени.

Анализ кривой затухания в двухэкспоненциальном приближении для каждого образца дает 4 величины – два характерных времени (τ_1 и τ_2), и две предэкспоненты («амплитуды», A_1 и A_2). Пара чисел τ_1 и A_1 характеризует т.н. «быструю» компоненту, которая показывает, как быстро возбуждение из светособирающей антенны захватывается реакционным центром (первичное разделение зарядов с переносом электрона на феофитин). Вторая пара чисел, τ_2 и A_2 , соответствует времени жизни и амплитуде «медленной», или рекомбинационной, компоненты, которая возникает в том случае, если электрон, перенесенный от P_{680} на феофитин, не может быть стабилизирован

далее на хинонновом акцепторе Q_A (закрытые РЦ). В таком случае происходит рекомбинация электрона, находящегося на феофитине, и катиона P_{680}^+ , и образуется нейтральный P_{680} в возбужденном состоянии. Процесс рекомбинации сопровождается частичной безызлучательной потерей энергии, поэтому квантовый выход флуоресценции хлорофилла в составе ФСII даже при полностью закрытых РЦ никогда не достигает таких высоких значений, которые известны для хлорофилла в органических растворителях (более 15%).

Усредненные по повторностям результаты измерений по кривым затухания флуоресценции в суспензии представлены в таблице 4.2.1. Поскольку параметры A_1 и A_2 линейно зависят от содержания пигментов в образцах, а содержание это изменялась от образца к образцу (изменения оптической плотности на рис. 4.2.1 и 4.2.11), для корректного сравнения мы сразу приводим нормированные значения амплитуд (A_1^* и A_2^*) на единицу поглощенного возбуждающего света на длине волны возбуждения 455нм:

$$A_1^* = A_1/D_{455},$$

$$A_2^* = A_2/D_{455}.$$

Таблица 4.2.1. Значение параметров кривых затухания флуоресценции в суспензии S. quadricauda после 24 часовой инкубации в темновых и световых условиях в контроле и в присутствии меди в концентрации 10 мкМ.

Образец	τ_1 , нс	τ_2 , нс	A_1^* , отн. ед.	A_2^* , отн. ед.	$A_1^* \cdot \tau_1$	$A_2^* \cdot \tau_2$	доля медленной компоненты
Контроль Темновая инкубация	0,447	1,165	87,0	108,7	39	127	0,77
Контроль Световая инкубация	0,426	1,03	84,0	138,8	36	143	0,80
Cu 10 мкМ Темновая инкубация	0,452	1,201	45,9	86,9	21	104	0,83
Cu 10 мкМ Световая инкубация	0,372	1,07	51,2	98,0	19	105	0,85

Характерное время быстрой компоненты затухания τ_1 в контроле составило около 425-445 пс. Небольшие отличия в зависимости от

световой/темновой инкубации находятся в пределах ошибки метода. При действии меди на свету характерное время τ_1 уменьшилось от 426 до 372 пс (всего на 13%). В темноте медь не влияла на время τ_1 .

Характерное время рекомбинационной компоненты τ_2 составило в контроле порядка 1100 пс, и также практически не изменялось в зависимости от темновой/световой инкубации (1165-1200 пс). Заметного влияния меди на величину τ_2 мы не обнаружили.

Мы оценили численно вклад рекомбинационной компоненты в общую площадь под кривой затухания («доля медленной компоненты», 4.2.1). Здесь хорошо видно, что во всех образцах она очень высока (0,77-0,85). Это говорит о том, что в процессе измерений кривых затухания состояние реакционных центров ФСII в клетках следует отнести к преимущественно закрытому. Такое состояние, очевидно, возникало в процессе интенсивного светового облучения образцов лазером и довольно длительного накопления сигналов. Это обстоятельство само по себе не является ни «хорошим» ни «плохим», но оно позволяет утверждать, что в наших экспериментальных условиях площадь под кривой затухания флуоресценции должна соответствовать величине максимальной флуоресценции F_m при стационарном облучении.

Как было замечено выше, в суспензиях клеток медь не оказывала влияния на длительность компонент затухания флуоресценции. Более существенные изменения под действием токсиканта происходят с амплитудами компонент. Видно (табл. 4.2.1), что амплитуда быстрой (A_1^*) и медленной (A_2^*) компонент уменьшается в 1,5-2 раза. Также в 1,5-2 раза уменьшается площади под быстрой и медленной компонентой (параметры $A_1^* \cdot \tau_1$ и $A_2^* \cdot \tau_2$). Это согласуется с уменьшением удельной максимальной флуоресценции F_m^* , которое мы наблюдали в суспензиях на флуориметре AquaRep (рис. 4.2.5 В, Cu-10мкМ) и с уменьшением максимальной флуоресценции на клетку (F_{st} на рис. 4.2.7).

Таким образом, по данным измерений кинетики затухания флуоресценции в суспензиях показано наличие тушения при действии меди.

Причем тушение это проявляется лишь на уровне амплитуд. Явных признаков динамического тушения, при котором бы сокращалось время жизни флуоресценции, по этим измерениям не выявлено. Нам известен только один механизм тушения, который бы объяснял такие результаты – это тушение при переносе светособирающих комплексов от ФСII к ФСI, также известный как «State1-to-State2 transition». Еще в 1987 на водоросли рода *Scenedesmus* было показано, что при таком процессе времена затухания флуоресценции хлорофилла остаются постоянными в пределах отклонений 5% (Wendler J, Holzwarth AR. 1987), а тушение амплитуд обусловлено уменьшением размера антенных комплексов ФСII. Известно также, что сигналом к запуску «State1-to-State2 transition» в физиологических условиях (без токсиканта) является восстановление пула хинонов. Возможно медь при больших концентрациях индуцирует именно такие переходы.

Таким образом для меди основные изменения, наблюдаемые в амплитудах компонент распада, в то время как время жизни меняется незначительно позволяет говорить о возникновении тушения возбужденных состояний по статическому механизму, при котором время затухания меняется незначительно.

4.2.10. Влияние меди на параметры кривых затухания флуоресценции в пико- и наносекундном диапазоне на отдельных клетках

Мы провели дополнительные измерения пикосекундных кинетик затухания на отдельных точках изображений клеток при большом увеличении в поле зрения специального микроскопа (см. методы). Кинетики затухания были определены на одних и тех же изображениях клеток для двух разных спектральных диапазонов эмиссии - для 680нм и для 530нм. Канал 680нм соответствует хлорофиллу «а», а 530нм предположительно свободному и связанному с белками ФАД⁺ (FAD⁺). Кинетики из каждой точки изображения обрабатывали в двухэкспоненциальном приближении по аналогии с измерениями в суспензии. Затем для каждой точки изображения вычисляли среднее время жизни, τ_m , по формуле:

$\tau_m = A_1\tau_1 + A_2\tau_2$ после предварительной нормировки амплитуд $A_1 + A_2 = 1$.

По результатам расчёта τ_m изображения клеток были окрашены в искусственные цвета (рис. 4.2.26). При этом яркость каждой точки изображения соответствует интенсивности свечения (интеграл под кривой затухания), а цветовой оттенок – величине τ_m согласно цветовой шкале под каждым изображением.

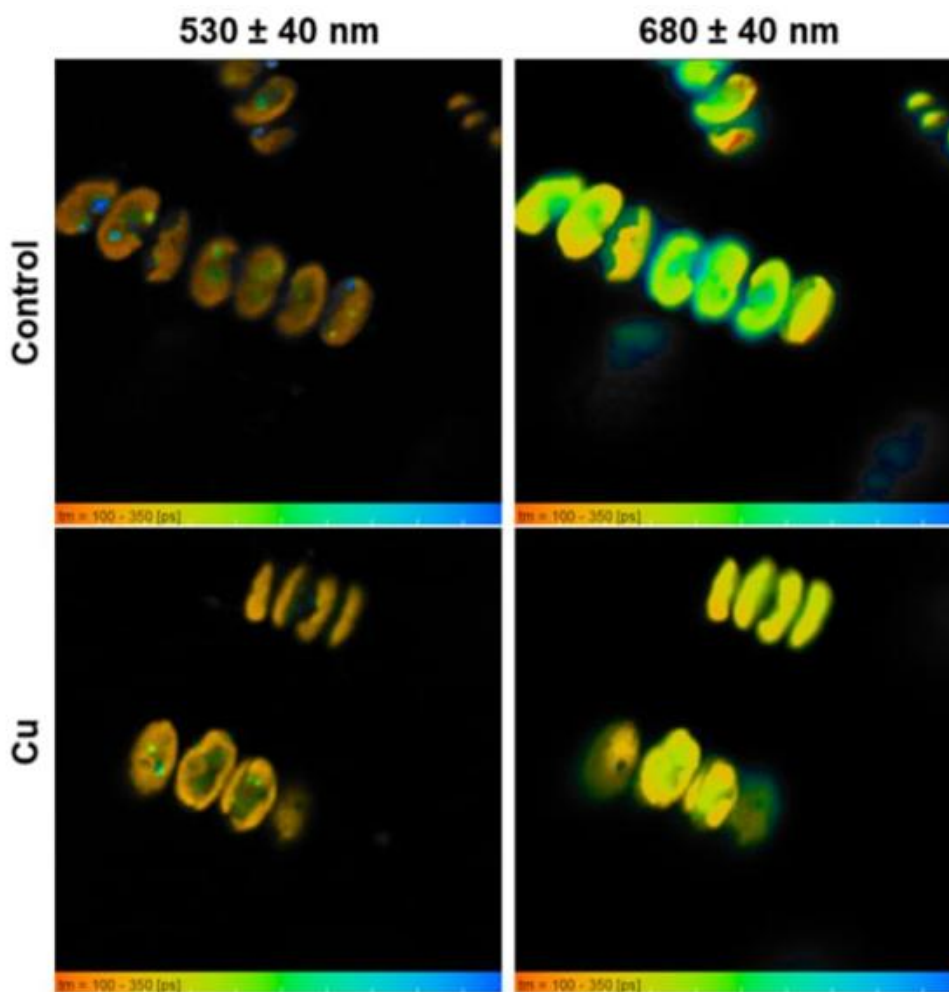


Рисунок 4.2.26. Изображения клеток *S. quadricauda* в цветовой шкале по среднему времени жизни флуоресценции τ_m в двух спектральных диапазонах. Слева – диапазон 530 нм для контрольного образца (наверху) и образца через 24ч инкубации с ионами меди в концентрации 10 мкМ. Справа – диапазон 680 нм для контрольного образца (наверху) и образца через 24ч инкубации с ионами меди в концентрации 10 мкМ.

Из рисунка 4.2.26 видно, что и в контроле и при действии меди содержимое клеток неоднородно как по интенсивности свечения, так и по

величине τ_m . Диапазон изменения τ_m составил 100-350 пс. Для численного сравнения контрольных изображений с изображениями клеток при действии токсиканта нами были дополнительно построены гистограммы распределений пикселей по параметру τ_m (рис. 4.2.27). Эти распределения построены только по светлым зонам изображений, которые автоматически разбиты по порогу интенсивности. Таким образом темные зоны между светящимися клетками мы не учитывали.

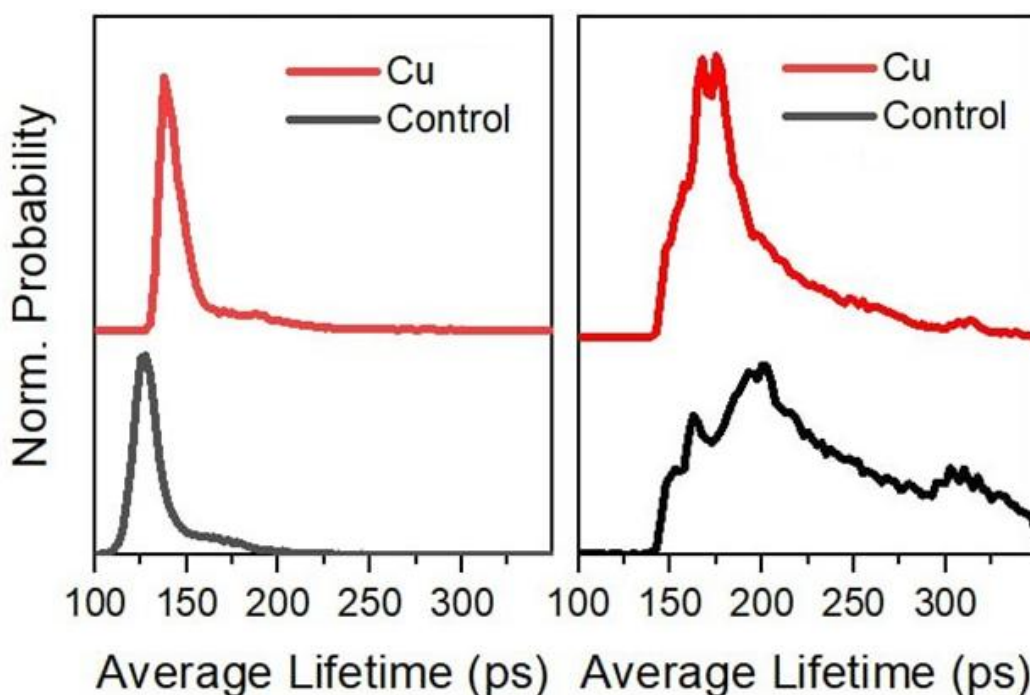


Рисунок 4.2.27. Распределение точек изображения по среднему времени жизни флуоресценции τ_m в двух спектральных диапазонах. Слева – диапазон 530нм для контрольного образца (внизу) и образца через 24ч инкубации с ионами меди в концентрации 10мкМ (вверху). Справа – диапазон 680нм для контрольного образца (внизу) и образца через 24ч инкубации с ионами меди в концентрации 10мкМ (вверху).

В канале 680нм (хлорофилл, рис. 4.2.26 справа) в образце с ионами меди можно видеть ценобии, где интенсивно светятся все 4 клетки, а также ценобии, в которых есть затемненные клетки. Это согласуется с тем, что мы наблюдали ранее по ОЈ-сигналам на отдельных клетках. Анализ гистограмм распределений показывает, что в целом при действии меди время жизни

сдвигается в область более коротких величин (рис.4.2.27 справа). Если в контроле максимум распределения находится в области 200 пс, то при действии меди он смещается в область 170 пс. Данные наблюдения говорят о накоплении в клетках зон с наиболее коротким временем жизни. Эти зоны могут соответствовать свечению ФСІ, которое из-за очень короткого времени жизни (30-80 пс) обычно ускользает от внимания при анализе усредненных (по клеткам в суспензии) кривых затухания в двух экспоненциальном приближении.

В канале 530нм (ФАД⁺, рис. 4.2.27 слева) распределение среднего времени жизни при добавлении меди также изменяется. Однако в данном случае происходит увеличение τ_m , и максимум распределения смещается от 130 пс в контроле к 145 пс в образце с концентрацией меди 10 мкМ.

По имеющейся информации (М.С. Skala, et al. 2007) увеличение τ_m говорит об увеличении доли свободного ФАД⁺ и уменьшении доли ФАД⁺, связанного с белками. Причины, по которым это происходит, мы обсуждать не готовы, однако можно сказать что зеленая флуоресценция является чувствительным к действию меди индикатором. В целом распределение по τ_m для зеленой флуоресценции получается гораздо более узкое (и в контроле, и при действии токсиканта), чем распределение по τ_m для красной флуоресценции хлорофилла.

4.2.11. Обобщение результатов по действию меди на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* с помощью методов регистрации флуоресценции хлорофилла при культивации водорослей с ионами Cu^{2+} в темновых и световых условиях.

Таки образом, проведенное исследование влияния ионов Cu^{2+} на первичные процессы фотосинтеза пресноводных микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* выявило ряд важных аспектов воздействия этого токсиканта на фотосинтетический аппарат клеток.

Так влияние на содержание пигментов выявило, что при концентрациях

Cu^{2+} 0,1 и 1 мкМ не наблюдалось значительных изменений в содержании хлорофилла и каротиноидов. При концентрации 10 мкМ Cu^{2+} отмечено существенное снижение содержания обоих типов пигментов, причем каротиноиды оказались более устойчивыми к повреждению. Это может указывать на то, что при высоких концентрациях медь вызывает деградацию пигментов, возможно, через окислительное повреждение.

При исследовании изменения в параметрах флуоресценции выявлено, что относительная переменная флуоресценция (F_v/F_m) в суспензии клеток показала незначительные изменения даже при высоких концентрациях меди. Однако измерения на отдельных клетках выявили более существенное снижение фотохимического квантового выхода ФСII ($\Delta F/F_{st}$) при действии 10 мкМ Cu^{2+} . Это различие подчеркивает важность исследований на уровне отдельных клеток для выявления эффектов, которые могут быть замаскированы при измерениях в суспензии. Так, измерения на отдельных клетках показали значительное увеличение гетерогенности популяции по параметрам флуоресценции при действии меди. При концентрации 10 мкМ Cu^{2+} наблюдалось разделение популяции на две группы: с высокой и низкой интенсивностью флуоресценции. Это может указывать на различную чувствительность отдельных клеток к токсическому действию меди, что может быть связано с различиями в физиологическом состоянии клеток или наличием механизмов устойчивости у части популяции.

При изучении влияния меди на электронный транспорт, анализ ОЖР-кривых выявил изменения в форме кривых при действии меди, особенно при высоких концентрациях. Наблюдалось снижение уровней флуоресценции J, I и P, что указывает на ингибирование электронного транспорта на донорной стороне ФСII. Увеличение параметров V_J и M_0 свидетельствует о нарушении электронного транспорта между Q_A и Q_B , что приводит к накоплению Q_B -невосстанавливающих центров.

Также при действии меди наблюдалось увеличение нефотохимического тушения (NPQ), особенно в световых условиях. Это может указывать на

активацию защитных механизмов, в частности виолаксантинового цикла, для предотвращения фотоингибирования.

При анализе результатов выявлены различия между влиянием меди при световых и темновых условиях инкуции. В целом, действие меди было более выраженным в темновых условиях. Это может быть связано с тем, что в световых условиях фотосинтез стимулирует процессы репарации клеток, частично компенсируя токсическое действие меди.

Анализ измерения кинетики затухания флуоресценции выявил изменения в амплитудах компонент, но не в их длительности. Это может указывать на статический механизм тушения, связанный с переносом светособирающих комплексов от ФСII к ФСI (State1-to-State2 transition).

Анализ затухания флуоресценции и анализ изображений на отдельных клетках показал изменения в распределении среднего времени жизни флуоресценции как для хлорофилла, так и для ФАД⁺. Что может указывать на комплексное воздействие меди на различные компоненты фотосинтетического аппарата и метаболизма клеток.

В целом, результаты исследования демонстрируют, что медь оказывает многоплановое воздействие на фотосинтетический аппарат *S. quadricauda*, затрагивая различные аспекты его функционирования. Особенно важным является выявление гетерогенности ответа популяции на действие токсиканта, что подчеркивает необходимость исследований на уровне отдельных клеток для полного понимания механизмов токсического действия меди на фотосинтетические организмы.

4.3. Исследование воздействие ионов Ag^+ в разных концентрациях на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* с помощью методов регистрации флуоресценции хлорофилла при культивации водорослей с ионами Ag^+ в темновых и световых условиях

Опыт по действию серебра на *Scenedesmus quadricauda* также, как и ранее был поставлен в двух вариантах — в темноте и при постоянном

освещении с теми же физическими характеристиками, как и при действии меди. Также вначале рассмотрим то, как действует серебро при постоянном световом воздействии. Особенности влияния серебра в условиях темного метаболизма будут рассмотрены отдельно.

4.3.1. Действие серебра на пигментный состав в культуре микроводоросли *S. quadricauda* при инкубации на свету

Результаты по спектрам поглощения

Исследовано влияние ионов серебра на поглощение в области хлорофилла *a* (678 нм) при световых условиях инкубации.

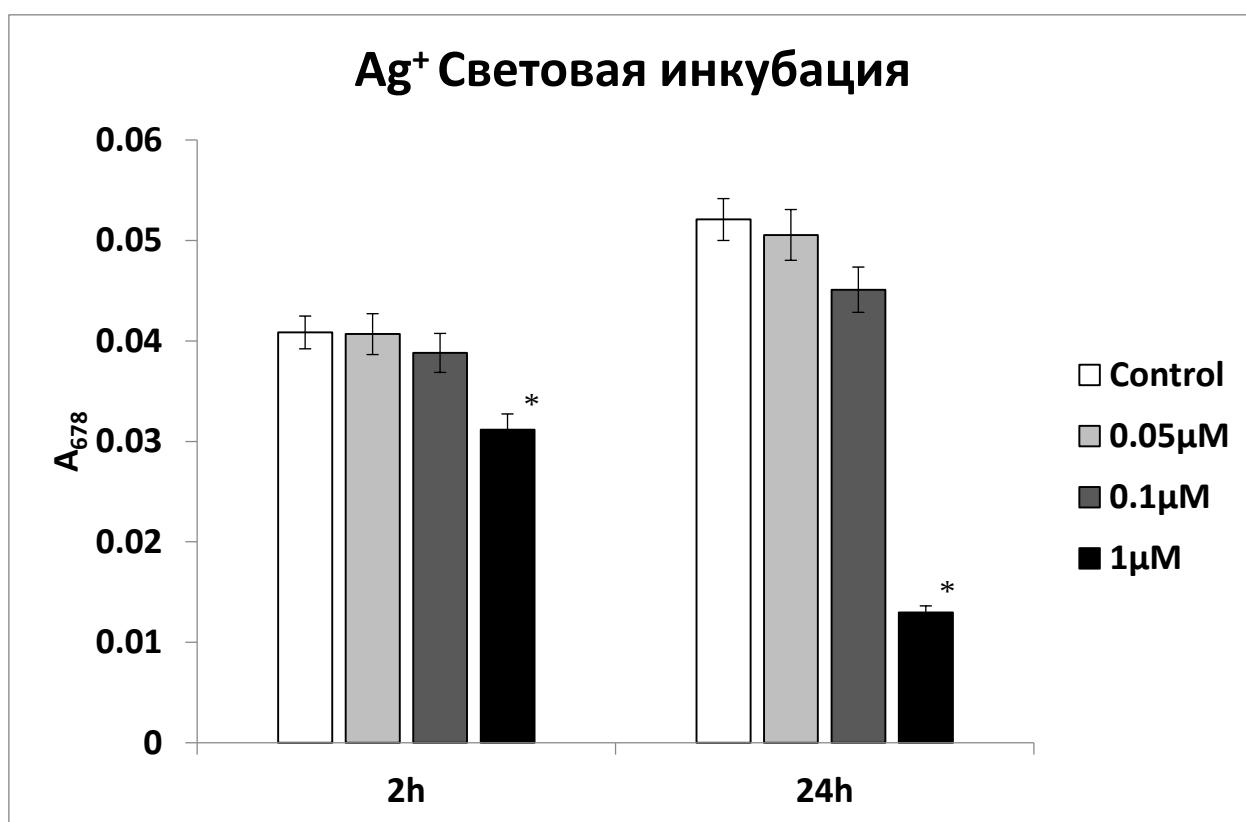


Рис.4.3.1. Изменение оптической плотности в полосе поглощения хлорофилла «а» ($\lambda_{\max}=678$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Как видно из рисунка 4.3.1, в данном эксперименте в условиях световой инкубации за 24 часа в закрытом флаконе в контрольных условиях

происходит увеличение содержания хлорофилла примерно на 26% по сравнению с таковым при 2 часах инкубации. Оптическая плотность в образцах с содержанием 0,05 и 0,1 мкМ не значительно изменяется по сравнению с контролем. Действие же серебра в наибольшей, исследованной концентрации 1 мкМ сопровождается достоверным уменьшением оптической плотности по сравнению с контролем, более выраженном при 24 часах инкубации (рис. 4.3.1). Следует обратить внимание на то, что подобный эффект снижения концентрации хлорофилла наблюдается при действии меди в концентрации в 10 выше (рис. 4.2.1 медь). Таким образом серебро проявляет более токсический эффект на этот параметр по сравнению с медью при их одинаковых концентрациях.

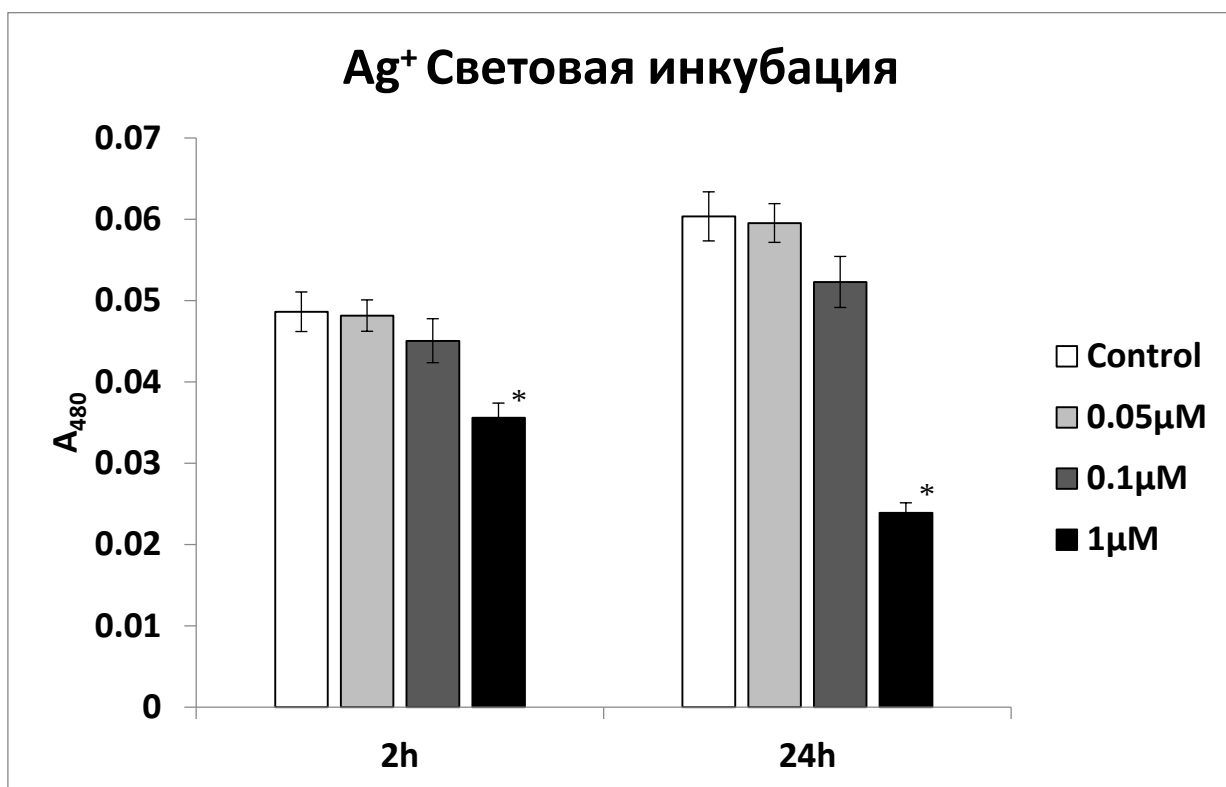


Рис. 4.3.2. Изменение оптической плотности в полосе поглощения каротиноидов ($\lambda_{\max}=480$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Также исследовано влияние ионов серебра на поглощение в области полосы каротиноидов (480 нм) при световых условиях инкубации (рис. 4.3.2).

Поглощение каротиноидов также увеличивается при увеличении времени инкубации от 2 до 24 в контроле (примерно на 22%). И почти не изменяется при действии серебра в среде инкубации клеток при концентрациях серебра 0,05 и 0,1 мкМ по сравнению с контролем, независимо от времени инкубации, но постепенно уменьшается при действии серебра в концентрации 1 мкМ (рис. 4.3.2). Также, как и уменьшение поглощения хлорофилла эффект снижения поглощения каротиноидов увеличивается со временем. Снижение каротиноидов меньше чем снижение Хл. Но этот эффект более выражен для серебра по сравнению с медью при той же концентрации (рис.4.2.2, медь).

Также исследовано влияние серебра на отношение поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов (рис.4.3.3).

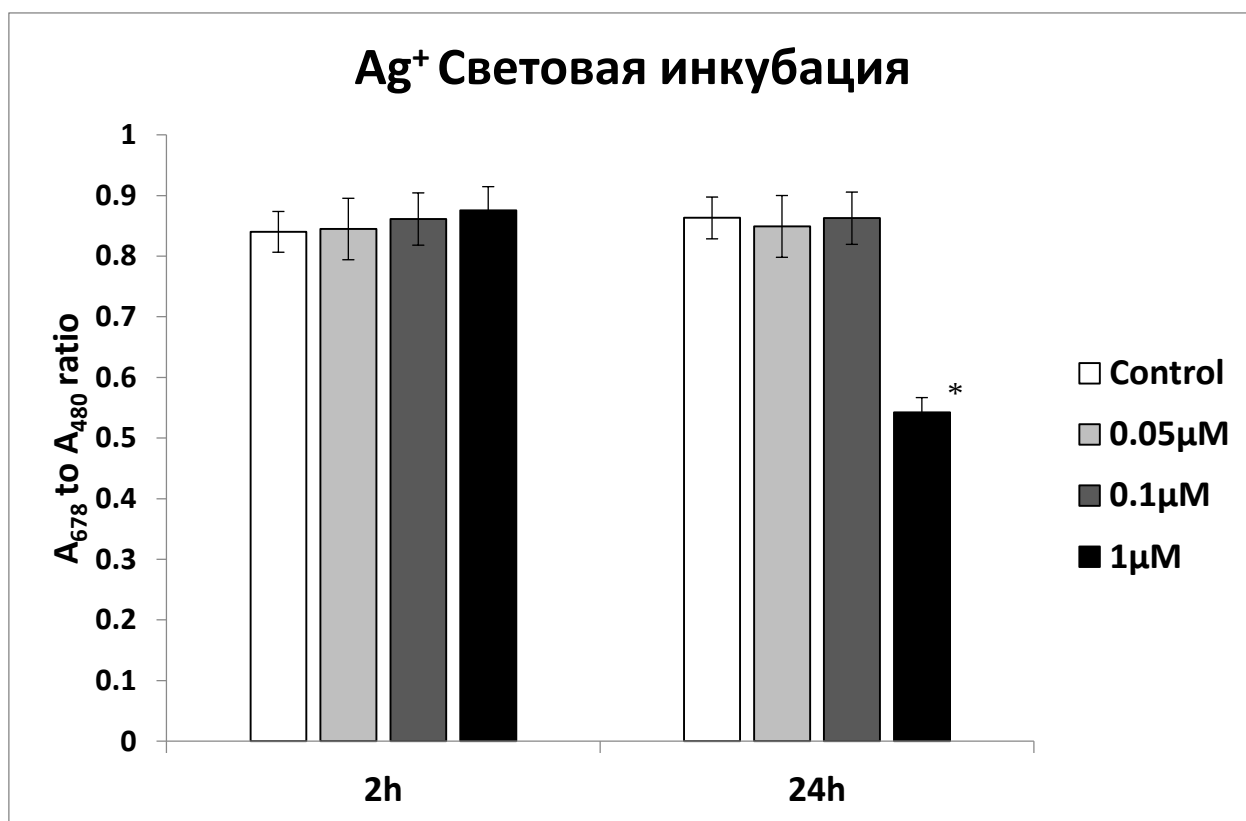


Рис. 4.3.3. Изменение интенсивности поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2

и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

* — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Отношение поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов через 2 часа инкубации в световых условиях практически не изменяется при действии ионов серебра во всех исследуемых концентрациях по отношению к контролю, но при увеличении времени инкубации клеток с серебром, наблюдается значительный эффект снижения, исследуемого параметра, почти на 40% (рис. 4.3.3). Такое снижение исследуемого параметра указывает на разрушающее действие серебра в световых условиях инкубации, которое еще не значительно в первые 2 часа инкубации и увеличивается со временем. Следует отметить что при действии меди такой эффект снижения был значительно ниже при ее максимальной концентрации (концентрация в 10 раз выше чем концентрация серебра, рис. 4.2.3 медь).

Таким образом, из рисунков 4.3.1-3 следует, что при световых условиях инкубации в присутствии серебра в относительно низких концентрациях (0,05 и 0,1 мкМ) содержание хлорофилла и каротиноидов практически не изменяется. При относительно высокой концентрации серебра (1 мкМ) наблюдается постепенное разрушение хлорофилла и каротиноидов. При этом каротиноиды оказываются более устойчивыми к токсическому действию серебра. Используя предыдущий методический подход, учитывая, что изменение содержания пигментов влияет на интенсивность флуоресценции хлорофилла (параметры F_o и F_m), и необходимости учитывать это при анализе данных флуоресценции, мы учитывали это влияние далее путем расчета удельных параметров F_o^* и F_m^* , чтобы точно отслеживать влияние меди на фотохимическое и нефотохимическое тушение (далее в работе).

4.3.2. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток *S. quadricauda* при их инкубации в световых условиях

Также, как и в случае с медью (рис. 4.2.4) мы исследовали влияние серебра на суспензию клеток *Scenedesmus quadricauda*, регистрируя параметр

- относительную переменную флуоресценцию (F_v/F_m), показывающий эффективность фотосинтетического аппарата микроводорослей (рис. 4.3.4).

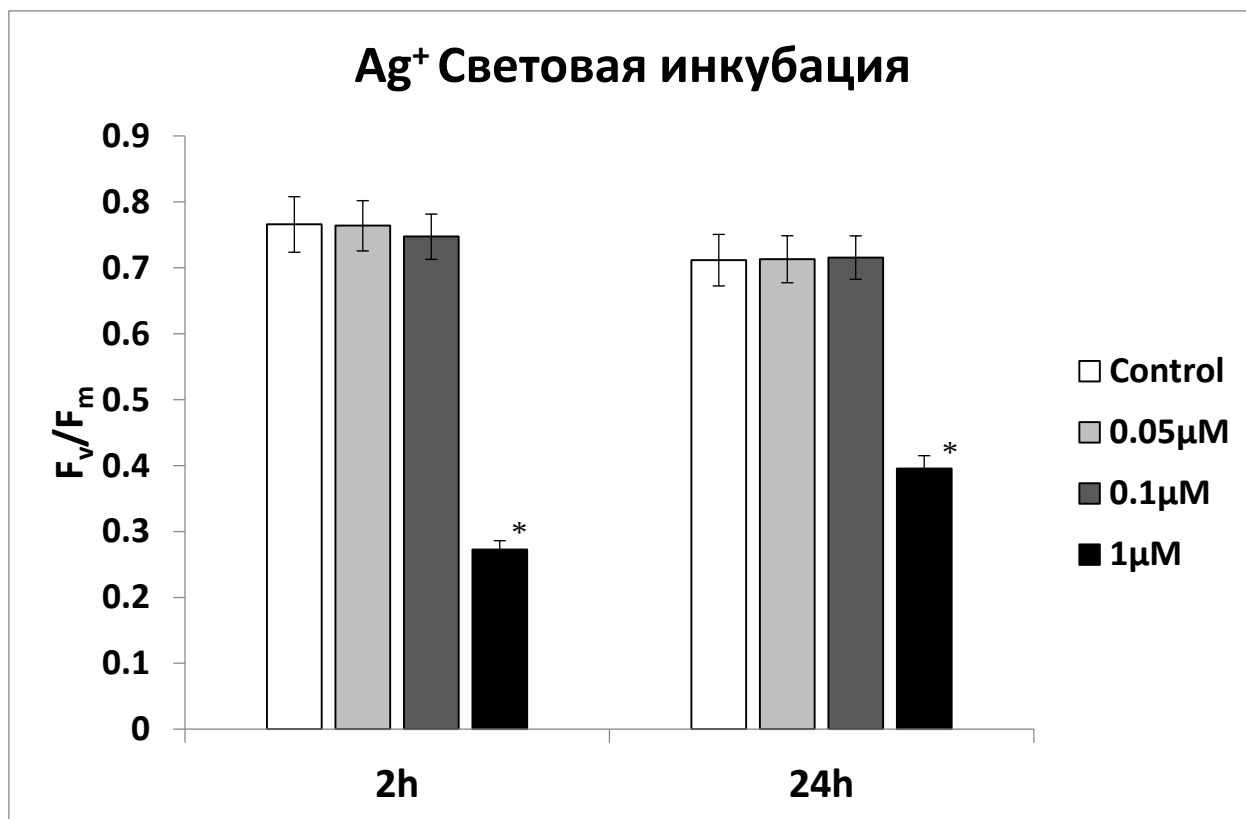


Рис. 4.3.4. Изменение относительной переменной флуоресценции хлорофилла культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Из рис. 4.3.4 видно, что относительная переменная флуоресценция хлорофилла в световых контрольных условиях при увеличении времени инкубации от 2ч до 24ч уменьшается незначительно. Серебро в концентрациях 0,05 и 0,1мкМ не влияет на значение параметра F_v/F_m . Но увеличение концентрации серебра в среде инкубации микроводорослей до 1мкМ приводит к значительному достоверному снижению F_v/F_m , указывающему на нарушение эффективности первичных фотосинтетических процессов в результате деструктивных процессов в фотосинтетических мембранах и в РЦ. При увеличении времени инкубации до 24 часов приводит частичное восстановлению величины этого параметра по сравнению с 2

часами инкубации, что может указывать на включение адаптационных репарационных процессов в условиях световой инкубации, что не происходит в условиях темновой инкубации (данные представлены в разделе по влиянию серебра в условиях темновой инкубации см. далее). Этот факт требует дальнейшего исследования. Следует напомнить, что данный эффект не наблюдался при действии меди при световой инкубации (рис. 4.2.4).

Также, как и в случае с медью (рис. 4.2.5) уточнения предполагаемых нами механизмов мы посмотрели, как изменяются отдельно F_0 и F_m и для исключения влияния концентрации пигментов на исследуемые параметры, мы делили исходные значения F_0 и F_m на оптическую плотность суспензии при длине волны возбуждения флуоресценции 450 нм (рис. 4.3.5).

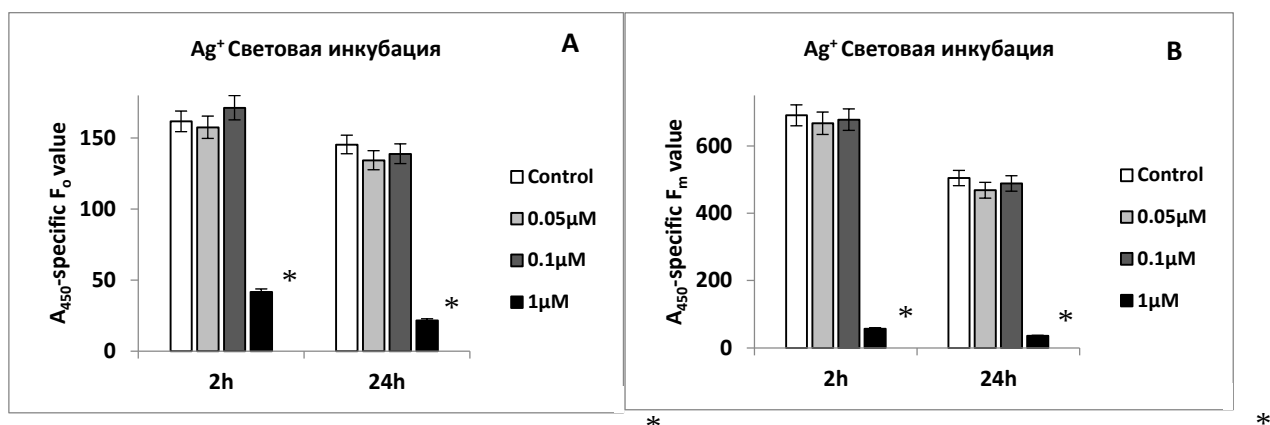


Рис. 4.3.5. Изменение удельных значений минимальной (А) и максимальной флуоресценции (В) (в расчете на единицу поглощенной световой энергии) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Из рис. 4.3.5А видно, что удельное значение интенсивности минимальной флуоресценции в расчете на единицу поглощенной световой энергии (F_0^*) в контроле с течением времени изменяется незначительно. Имеет место его незначительное уменьшение, примерно на 10% при увеличении времени инкубации от 2ч к 24ч (рис. 4.3.5А). Удельная максимальная флуоресценция (F_m^*) в контроле снижается примерно на 30%

от 2ч к 24ч (рис. 4.3.5В), что указывает на формирование некоторого уровня нефотохимического тушения, вероятнее всего в предшествующих измерению 5-ти минутной темновой адаптации. В малых (0,05 мкМ) и средних (0,1мкМ) концентрациях серебро не оказывает какого-либо действия на показатели F^*_o и F^*_m в сравнении с контролем. При более высокой концентрации 1мкМ, серебро вызывает значительное достоверное уменьшение и F^*_o и F^*_m , что указывает на сильное тушение возбужденных молекул хлорофилла по нефотохимическому пути. Этот эффект усиливается при увеличении времени инкубации.

Таким образом ионы серебра при концентрации 1 мкМ вызывают достоверное снижение содержания фотосинтетических пигментов и фотохимической активности микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* в условиях световой инкубации, что указывает на высокую токсичность серебра в этой концентрации. Часть энергии расходуется на нефотохимическое тушение, вероятнее всего за счет снижения доли активных РЦ. Полученные данные согласуются с данными полученными для других видов микроводорослей (Matorin, D. N., et al, 2013). По сравнению с медью серебро проявляет большую токсичность даже при меньших концентрациях.

4.3.3. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках *S. quadricauda* при их инкубации в световых условиях

Также, как и для меди (рис.4.2.6) мы провели измерения флуоресценции на одиночных клетках, предполагая их гетерогенность в общей популяции, в том числе и по их чувствительности к серебру в концентрациях – 0,05, 0,1 и 1 мкМ. Такая гетерогенность, была нами выявлена (рис.4.3.6).

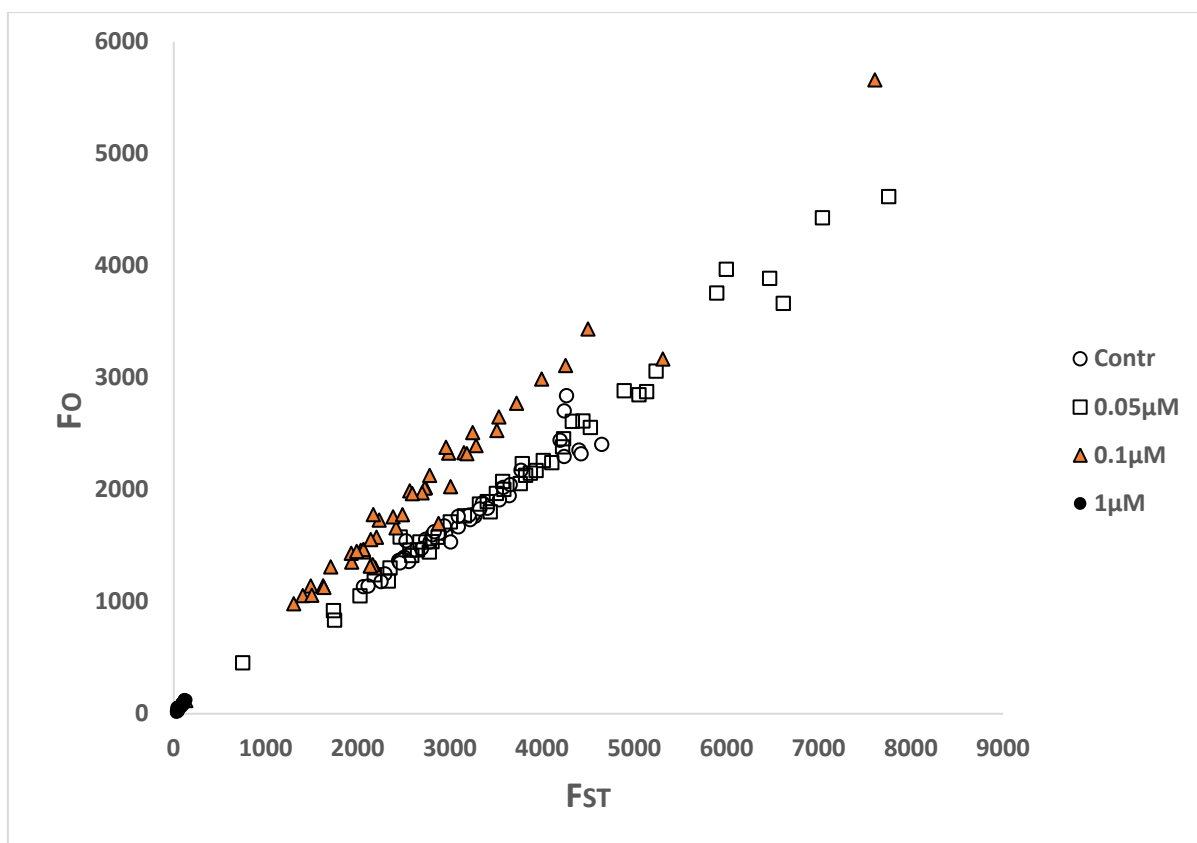


Рис. 4.3.6. Соотношения между интенсивностью максимальной (F_{st}) и интенсивностью минимальной (F_0) флуоресценции клетки в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии ионов серебра. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

На рисунке 4.3.6. можно увидеть значительную гетерогенность клеток по параметрам минимальной (F_0 на клетку) и максимальной (F_{st} на клетку) флуоресценции как в контроле, так и в образцах с содержанием ионов серебра в концентрациях 0,05 и 0,01 мкМ. Однако при концентрации серебра 10 мкМ наблюдается только популяции клеток с незначительными значениями, близкими к нулю (черные точки), параметров флуоресценции (F_0 и F_{st}).

Нами были рассчитаны также средние на клетку значения F_0 и F_{st} по данным FRR-микрофлуориметрии (рис. 4.3.7). В целом можно отметить, что удельные показатели на одну клетку изменяются в опыте гораздо сильнее,

чем те же показатели в расчете на единицу поглощенной энергии для суспензии клеток (Рис. 4.3.5 А, В, 24ч), что также указывает на потенциально более высокую чувствительность флуориметрии одиночных клеток и в этой серии экспериментов.

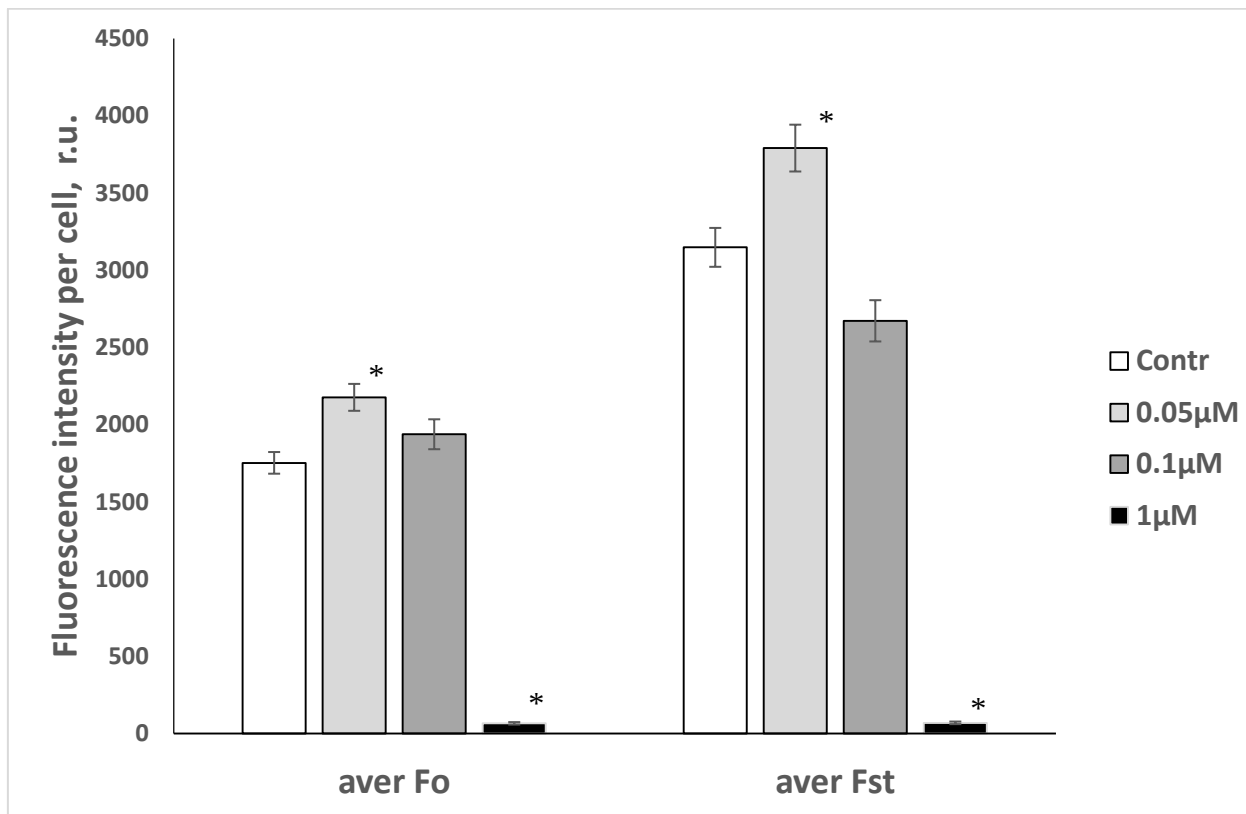


Рис. 4.3.7. Средние значения минимальной (F_o) и максимальной (F_{st}) флуоресценции на одну клетку культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии серебра. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

В этом конкретном случае удельные значения F_o и F_{st} в зависимости от концентрации серебра изменялись немонотонно. В концентрации 0,05 и 0,1 мкМ было зафиксировано увеличение F_o и F_{st} , а при большей концентрации 1 мкМ значительное уменьшение относительно контроля, почти до нулевого уровня (рис. 4.3.7). Следует отметить, что, если сравнивать результат с подобным действием меди (рис. 4.2.7), то эффект снижения, исследуемых параметров при действии серебра гораздо сильнее, при этом максимальная концентрация серебра в 10 раз меньше чем меди.

Также, как и в случае действия меди на, увеличение значения исследуемых параметров флуоресценции одиночных клеток при действии малых концентраций серебра может быть связано с тем, что в применяемой нами методике не было достаточной темновой адаптации перед измерением (рис. 4.3.7, концентрация 0,05 и 0,1мкМ). Наблюдаемый, обратный эффект сильного снижения, параметров F_0 и F_{st} при концентрации серебра 1 мкМ связан с тем, что больший вклад в этом случае вносит нефотохимическое тушение и выцветания хлорофилла, который также подтверждается данными, показывающими снижение поглощения хлорофилла (рис. 4.3.1, концентрация 1 мкМ).

Как и в предыдущих сериях экспериментов по изучению действия меди (рис.4.2.8) по регистрации флуоресценции на одиночных клетках выявлен факт, неоднородной реакции клеток на действие серебра в максимальной, исследуемой концентрации 1мкМ (рис. 4.3.8).

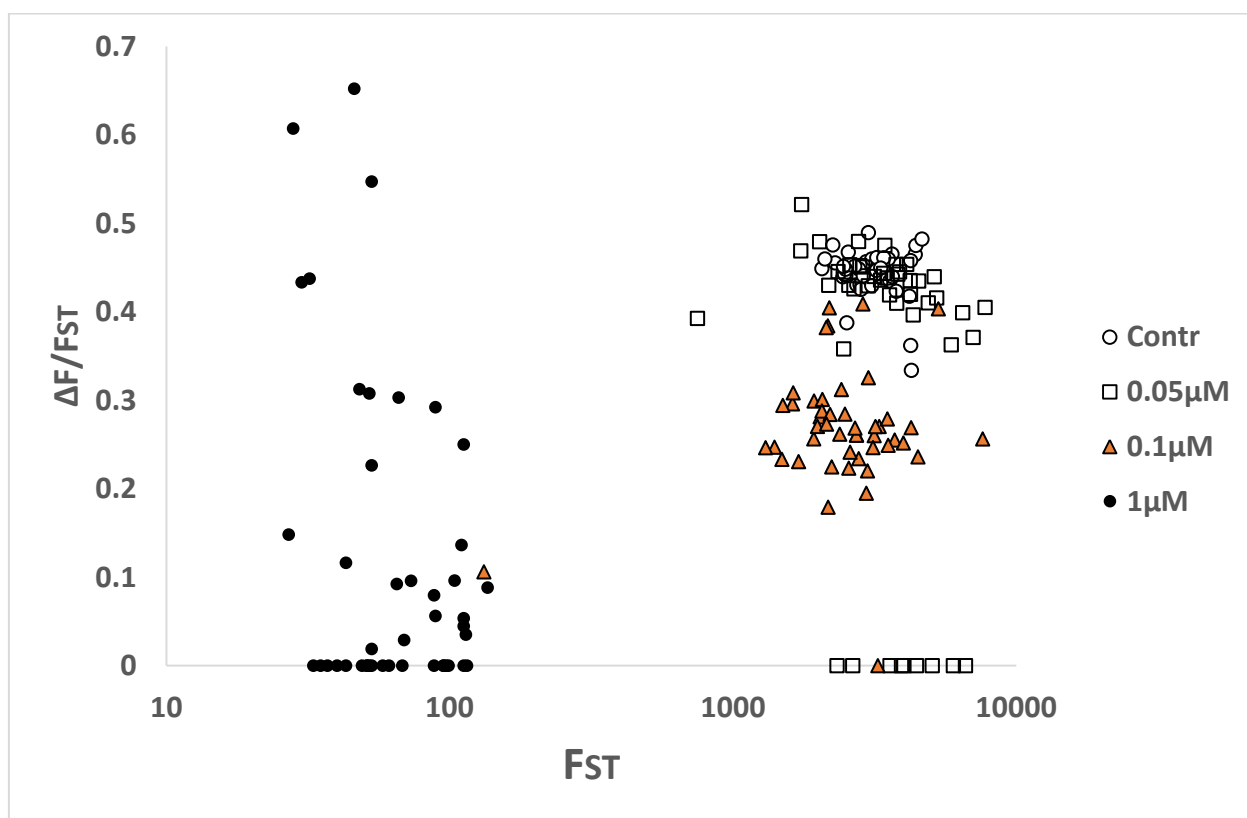


Рис. 4.3.8. Соотношения между интенсивностью максимальной флуоресценции клетки (F_{st}) и фотохимическим квантовым выходом ФСII ($\Delta F/F_{st}$) в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии серебра. Максимальная флуоресценция

клетки (F_{st}) представлена в логарифмических координатах. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Так, наблюдается распределение клеток в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} (рис. 4.3.8, черные точки), в котором мы условно можем выделить три кластера – один с интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 30-53 отн. ед.) и высоким значением фотохимического квантового выхода ФСII (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0,43-0,65, рис. 4.3.8 черные точки слева и сверху), второй – с интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 48-112 отн. ед.) и небольшим значением фотохимического квантового выхода ФСII (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0,23-0,31, рис. 4.3.8 черные точки слева и посередине) и третий - с интенсивностью флуоресценции F_{st} (диапазон 33-136 отн. ед.) и небольшим значением фотохимического квантового выхода ФСII (диапазон $\Delta F/F_{st}$ 0-0,15, рис. 4.3.8 черные точки слева и снизу). Во всех этих кластерах наблюдалось низкое значение интенсивностью флуоресценции F_{st} по сравнению с контролем и образцами с меньшей концентрацией серебра.

В контроле клетки (рис. 4.3.8, прозрачные кружки) распределены в основном равномерно по одному кластеру, занимающему некоторую область (F_{st} – 2060-4645 отн. ед. и $\Delta F/F_{st}$ – 0,33-0,49). Интересно отметить, что при действии серебра в наименьшей концентрации 0,05 мкМ клетки распределены на два кластера: один со значением $\Delta F/F_{st}$ в районе нуля и второй с охватом широкой области (F_{st} – 749-7760 отн. ед. и $\Delta F/F_{st}$ – 0,36-0,52), то есть в этом кластере фотохимический квантовый выход ФСII ($\Delta F/F_{st}$) сопоставим с контрольным образцом, а значение F_{st} значительно отличается от контроля в краевых областях этого кластера. При действии средней концентрации серебра 0,1 мкМ наблюдается два основных кластера: первый с значениями параметров (F_{st} – 2160-5310 отн. ед. и $\Delta F/F_{st}$ – 0,38-0,4) и второй (F_{st} – 1400-7610 отн. ед. и $\Delta F/F_{st}$ – 0,18-0,33). Также в этом образце со средней концентрацией серебра (0,1 мкМ) зафиксированы одиночные клетки с низкими значениями F_{st} и $\Delta F/F_{st}$ близкими к значениям этих параметров при

высокой концентрации серебра (1 мкМ), чего не наблюдалось при действии низкой концентрации серебра (0,05мкМ), что указывает на некоторое проявление токсического действие серебра уже при этой концентрации.

Также, как и в предыдущих сериях экспериментов были рассчитаны средние значения по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII $\Delta F/F_{st}$ (рис. 4.3.9).

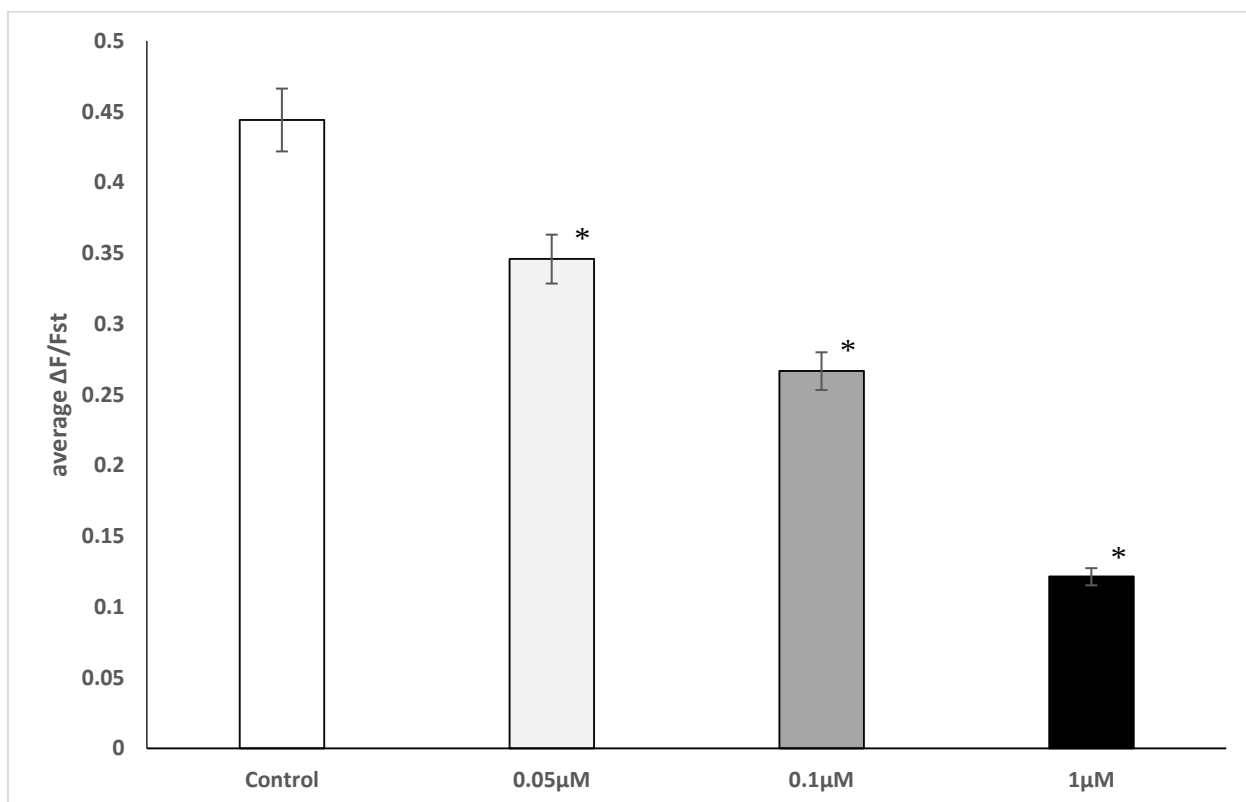


Рис. 4.3.9. Значения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода фотосистемы 2 культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии серебра. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

В контрольных условиях среднее по клеткам значение фотохимического квантового выхода ФСII (параметр $\Delta F/F_{st}$) составило около 0,44 (рис. 4.3.9), что заметно меньше, чем значение F_v/F_m (0,71), полученное стандартно при измерениях в суспензии клеток (рис. 4.3.4, 24ч). Эта разница имеет систематический характер и обусловлена различным состоянием закрытых

реакционных центров в тот момент, когда фиксируется максимальная флуоресценция (single turnover state vs multiple turnover state).

При добавлении серебра наблюдается дозависимое снижение параметра $\Delta F/F_{st}$ (рис.4.3.9). Наблюдаемые изменения $\Delta F/F_{st}$ на индивидуальных клетках значительно более выражены, чем изменения значений F_v/F_m , полученных стандартно при измерениях в суспензии клеток (рис. 4.3.4, 24ч). Особенно сильное различие наблюдается при действии малой и средней концентрации серебра (0,05 и 0,1мкМ соответственно).

Таким образом, по данным микрофлуориметрии мы выявили различные аспекты действия серебра на популяцию клеток, которые не доступны методу регистрации флуоресценции в суспензии и обнаружили гетерогенность популяции клеток по их чувствительности к действию этого токсиканта. При этом особая гетерогенность наблюдалась при действии низкой и средней концентрации серебра. При большой концентрации серебра большинство клеток проявляло схожее уменьшение исследуемых параметров, что указывает на значительную токсичность серебра в этой концентрации. Тем не менее использование микрофлуориметрического подхода выявляет уже проявляющуюся подпороговой токсичность средней концентрации серебра на более чувствительную субпопуляцию клеток и является перспективным подходом для выявления и изучения ранних рисков действия каких-либо токсикантов.

Дозависимый эффект снижения параметра $\Delta F/F_{st}$ при действии серебра был более выражен чем таковой в случае с медью (рис.4.2.9).

Также, как и в случае с медью (рис.4.2.10), для большей наглядности результаты измерений $\Delta F/F_{st}$ на клетках при действии серебра были представлены в виде гистограмм распределения (рис. 4.3.10).

Также, как и в случае с медью 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.

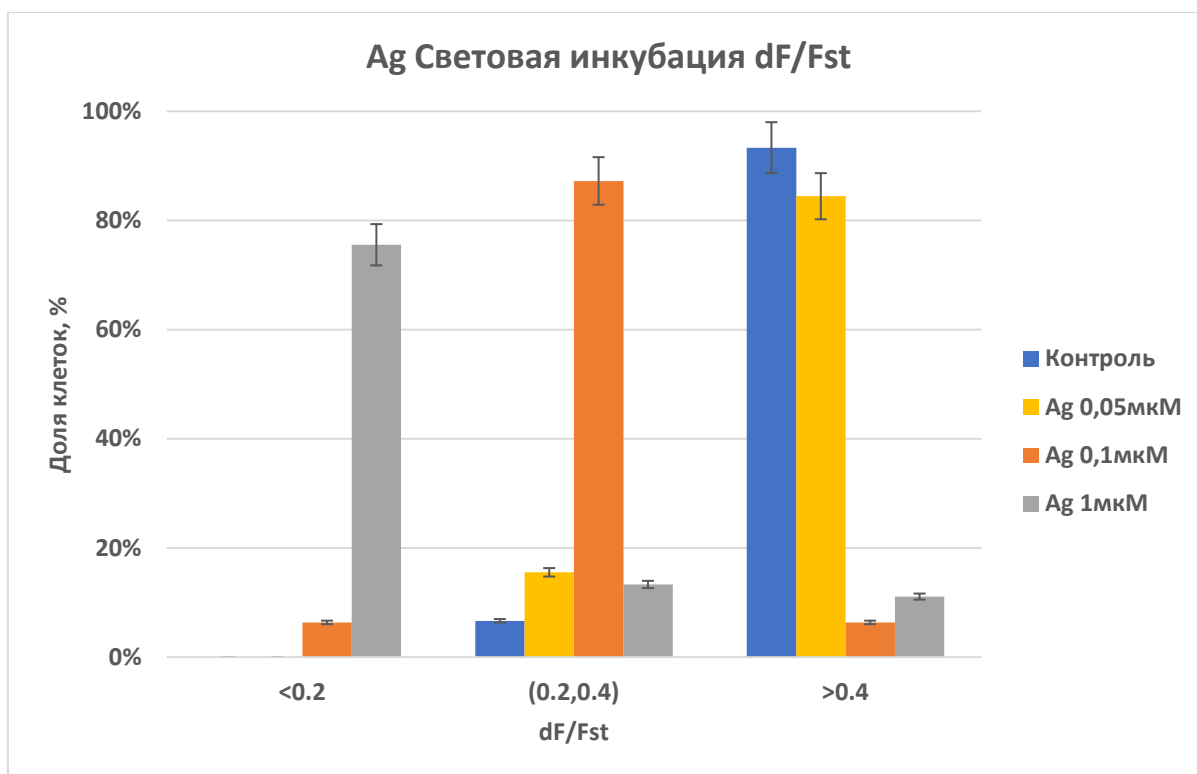


Рис. 4.3.10. Гистограммы распределения одиночных клеток по фотохимической активности ФСII. По оси абсцисс — относительная переменная флуоресценция ($\Delta F/Fst$); по оси ординат — доля клеток в %. Инкубация клеток в контроле и с ионами серебра до начала измерения проводилась в течение 24 ч при непрерывном освещении светом интенсивностью $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

На рис. 4.3.10. 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 серебра распределение клеток смещается в сторону «средней» и «низкой» категории. С увеличением концентрации серебра доля клеток, попадающих в «низкую» категорию увеличивается (рис. 4.3.10). Даже при гибели значительной части клеток, в популяции тем не менее остаются клетки с высоким значением $\Delta F/Fst$. Такая неоднородность реакции, как отмечалось выше, может иметь важное экологическое значение, обеспечивая выживание части популяции в стрессовых условиях за счет таких устойчивых к токсикантам клеток.

4.3.4. Действие серебра на пигментный состав в культуре микроводоросли *S. quadricauda* при инкубации в темновых условиях

Используя подход, описанный выше в этом разделе мы исследовали влияние ионов серебра на фотосинтетические пигменты в клетках микроводоросли *S. quadricauda* при темновой инкубации образцов с помощью абсорбционной спектроскопии.

Результаты по спектрам поглощения

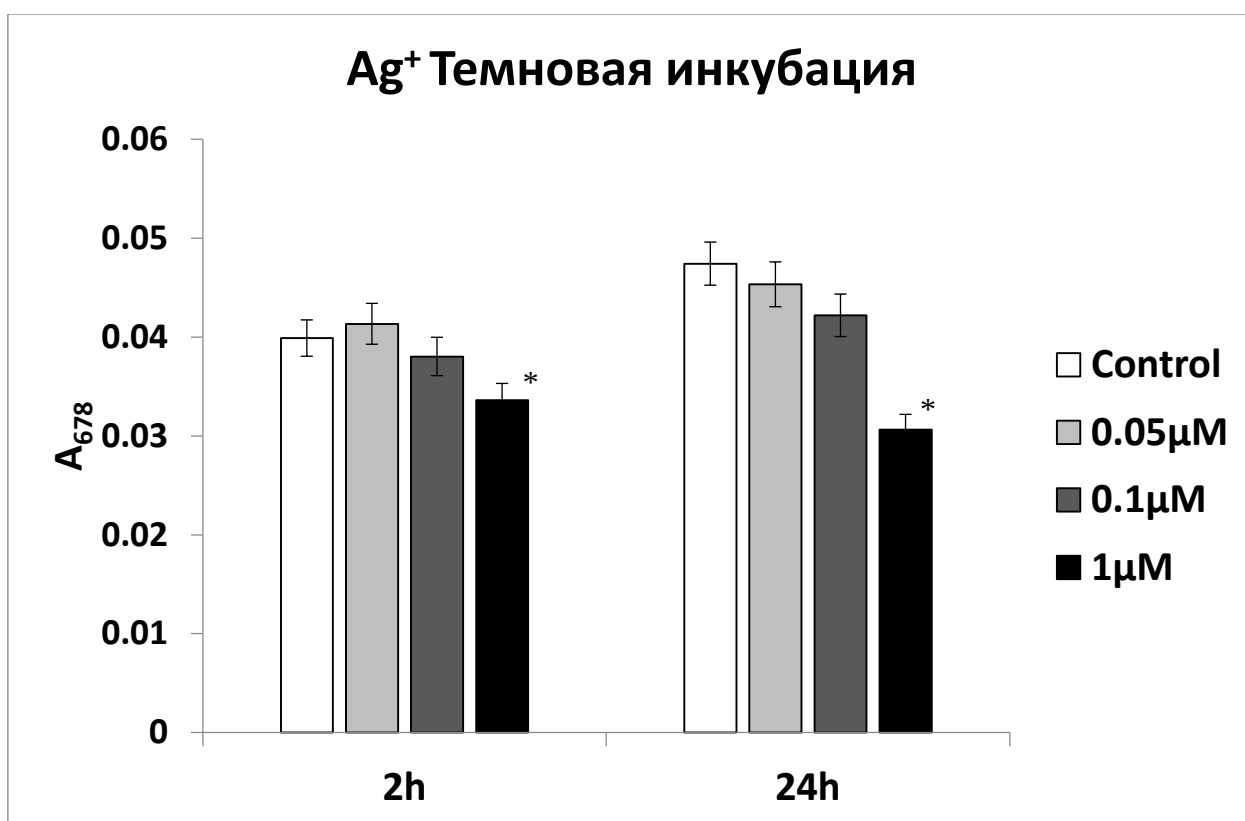


Рис.4.3.11. Изменение оптической плотности в полосе поглощения хлорофилла «а» ($\lambda_{\text{max}}=678$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Как видно из рисунка 4.3.11, условиях темновой инкубации клеток за 24 часа в закрытом флаконе в контрольных условиях происходит некоторое достоверное увеличение содержания хлорофилла. При этом оптическая плотность в образцах с содержанием серебра 0,05 и 0,1 мкМ не изменяется по отношению к контролю. Действие серебра в концентрации 1мкМ

сопровождается уменьшением оптической плотности с более выраженным эффектом при увеличении времени инкубации от 2 до 24 часов. Этот эффект менее выражен чем таковой при световых условиях инкубации (рис.4.3.1), что может указывать на возможное влияние света на усиление токсического действия серебра на молекулы хлорофилла. Предположительно, свет может усиливать генерацию АФК в присутствии ионов серебра. При этом, по нашему мнению, следует указать, что в тех же темновых условиях медь вызывает похожий эффект снижение этого параметра, но при концентрации в 10 раз больше (рис.4.2.12, медь темновая инкубация).

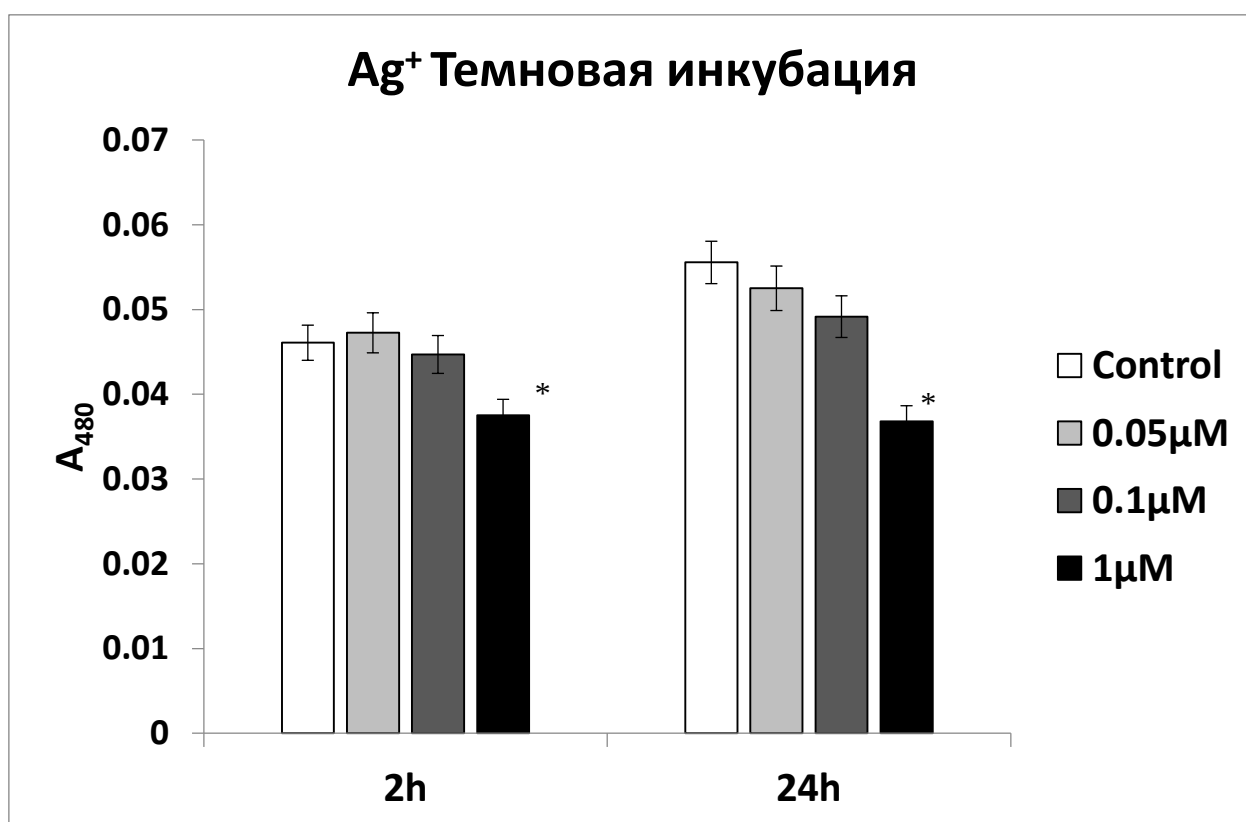


Рис. 4.3.12. Изменение оптической плотности в полосе поглощения каротиноидов ($\lambda_{\max}=480$ нм) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Поглощение каротиноидов при темновых условиях также, как и при световых почти не изменяется во времени инкубации при концентрациях серебра 0,05 и 0,1 мкМ, но постепенно уменьшается при действии серебра в

концентрации 1мкМ (рис. 4.3.12). Эффект снижения содержания каротиноидов при действии серебра в максимальной концентрации при темновой инкубации клеток менее выражен чем таковое действие в условиях световой инкубации (рис. 4.3.2).

Отношение же поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов через 2 и 24 часа инкубации практически не изменяется при всех концентрациях серебра (рис. 4.3.13). Что указывает на отсутствие деструктивного эффекта серебра в отсутствии света, по крайней мере в исследованных нами концентрациях.

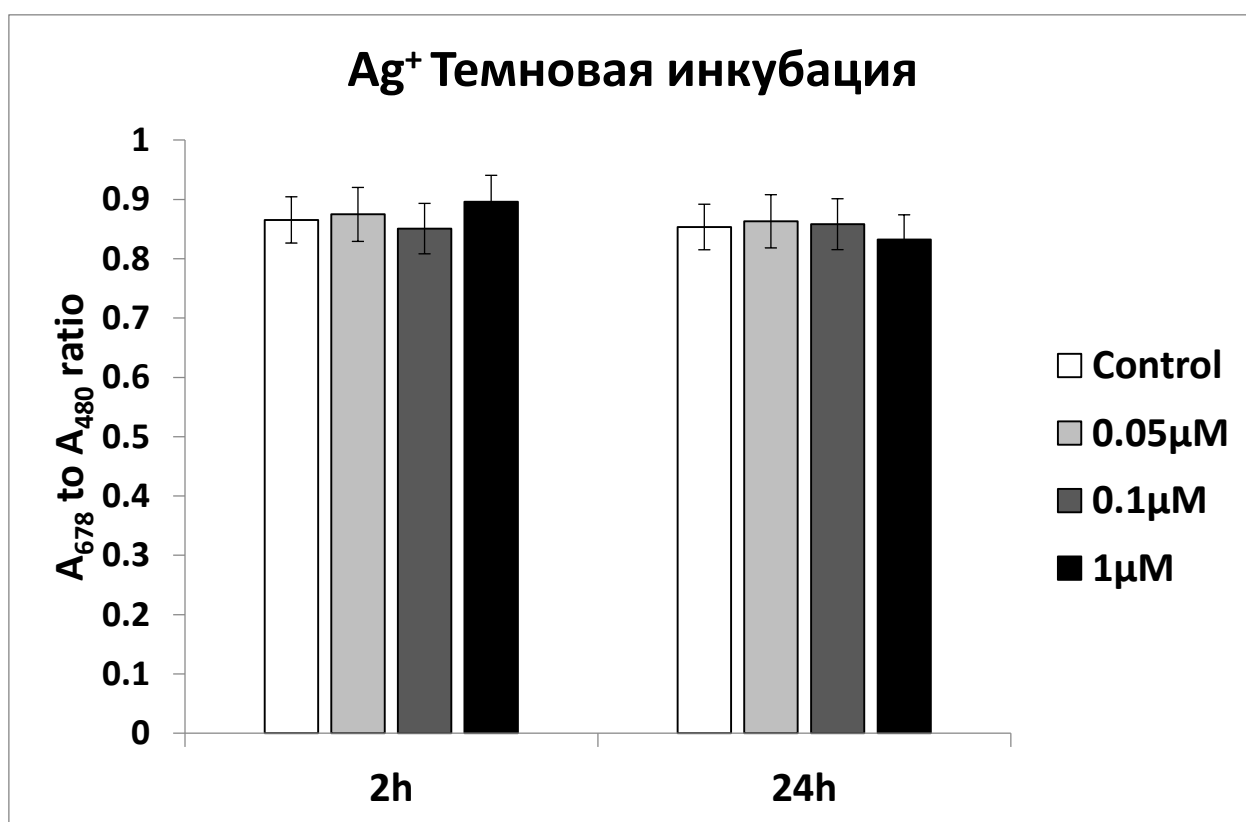


Рис. 4.3.13. Изменение интенсивности поглощения хлорофилла к поглощению каротиноидов культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения.

4.3.5. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток *S. quadricauda* при их инкубации в темновых условиях

Также, как и при световых условиях и при темновых условиях

инкубации клеток их относительная переменная флуоресценция хлорофилла в контрольных условиях при увеличении времени инкубации от 2ч до 24ч фактически не изменяется (рис. 4.3.14).

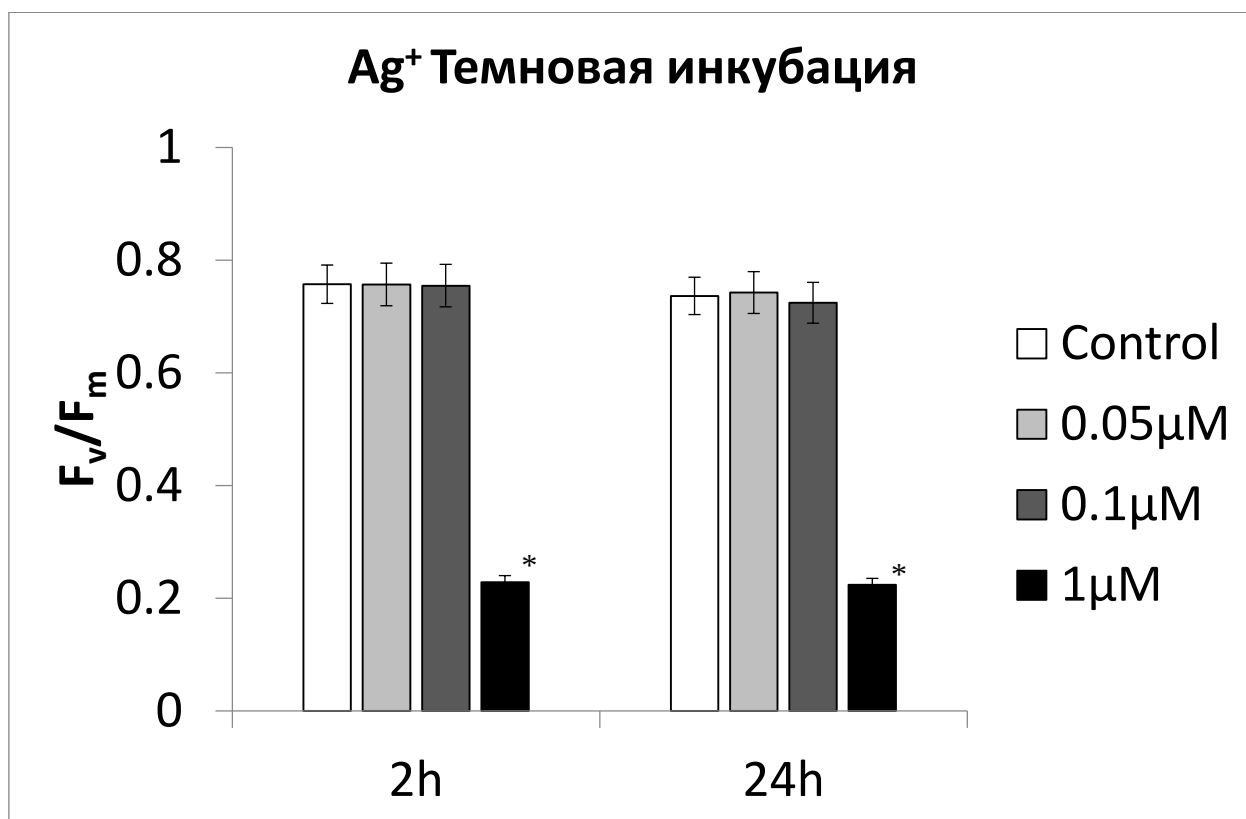


Рис. 4.3.14. Изменение относительной переменной флуоресценции хлорофилла культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

Серебро в концентрациях 0,05 и 0,1 мкМ так же, как и в случае световой инкубации не влияет на значение параметра F_v/F_m . Но увеличение концентрации серебра в среде инкубации микроводорослей до 1 мкМ приводит к значительному достоверному снижению F_v/F_m , указывающему на нарушение эффективности первичных фотосинтетических процессов в результате деструктивных процессов в фотосинтетических мембранах и РЦ. При этом увеличение времени не изменяет выраженность этого эффекта, что указывает на то, что основные деструктивные процессы происходят в первые два часа инкубации и отсутствие света не способствует активации

адаптационных репарационных процессов. Этот факт, как отмечалось выше, требует дальнейшего исследования и анализа.

Также, как и в соответствующих предыдущих разделах в случае с медью и серебром в световых условиях мы посмотрели, как изменяются отдельно F_0 и F_m при условиях темновой инкубации при действии серебра и в контроле. Чтобы исключить зависимость F_0 и F_m от концентрации пигментов, мы делили исходные значения F_0 и F_m на оптическую плотность суспензии при длине волны возбуждения флуоресценции 450 нм (рис. 4.3.15).

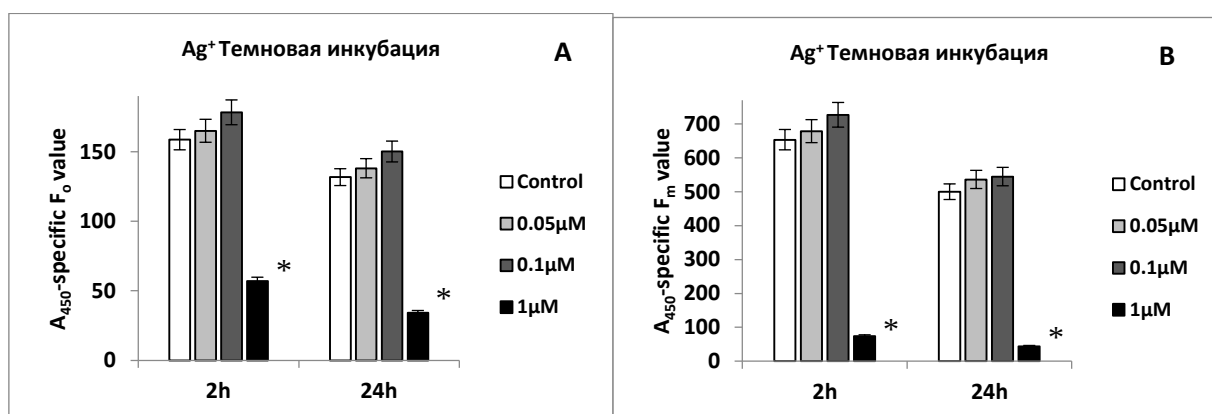


Рис. 4.3.15. Изменение удельных значений минимальной (А) и максимальной флуоресценции (В) (в расчете на единицу поглощенной световой энергии) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с серебром. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 2 и 24 ч в отсутствии освещения. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

В отличие от случая инкубации в условиях освещения (рис. 4.3.5А), удельное значение интенсивности минимальной флуоресценции в расчете на единицу поглощенной световой энергии (F^*_0) в контроле с течением времени в условиях темновой инкубации (рис. 4.3.15А) уменьшается на большую величину (17%).

При концентрациях серебра 0,05 и 0,01 мкМ в темновых условиях происходит некоторое недостоверное увеличение параметра (F^*_0) по сравнению с контролем. При концентрации серебра 1 м в темновых условиях происходит значительное снижение этого параметра по сравнению с контролем и более выраженное при увеличении времени инкубации.

Удельная максимальная флуоресценция (F_m^*) в темновых условиях в контроле снижается примерно на 23% от 2ч к 24ч (рис. 4.3.15В), что сравнимо с таковым при световых условиях инкубации (рис. 4.3.5В) и также указывает на некоторый уровень нефотохимического тушения в темновых условиях. При оценке влияния серебра в концентрациях 0,05 и 0,01мкМ на параметр (F_m^*) при темновой инкубации клеток из рисунка 4.3.15В видно, что он незначительно увеличивается по сравнению с контролем. При концентрации серебра 1 мкМ наблюдается достоверное значительное снижение этого параметра по сравнению с контролем почти на 90% через 2 и 24 часа инкубации.

4.3.6. Влияние серебра на интенсивности флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках *S. quadricauda* при их инкубации в темновых условиях

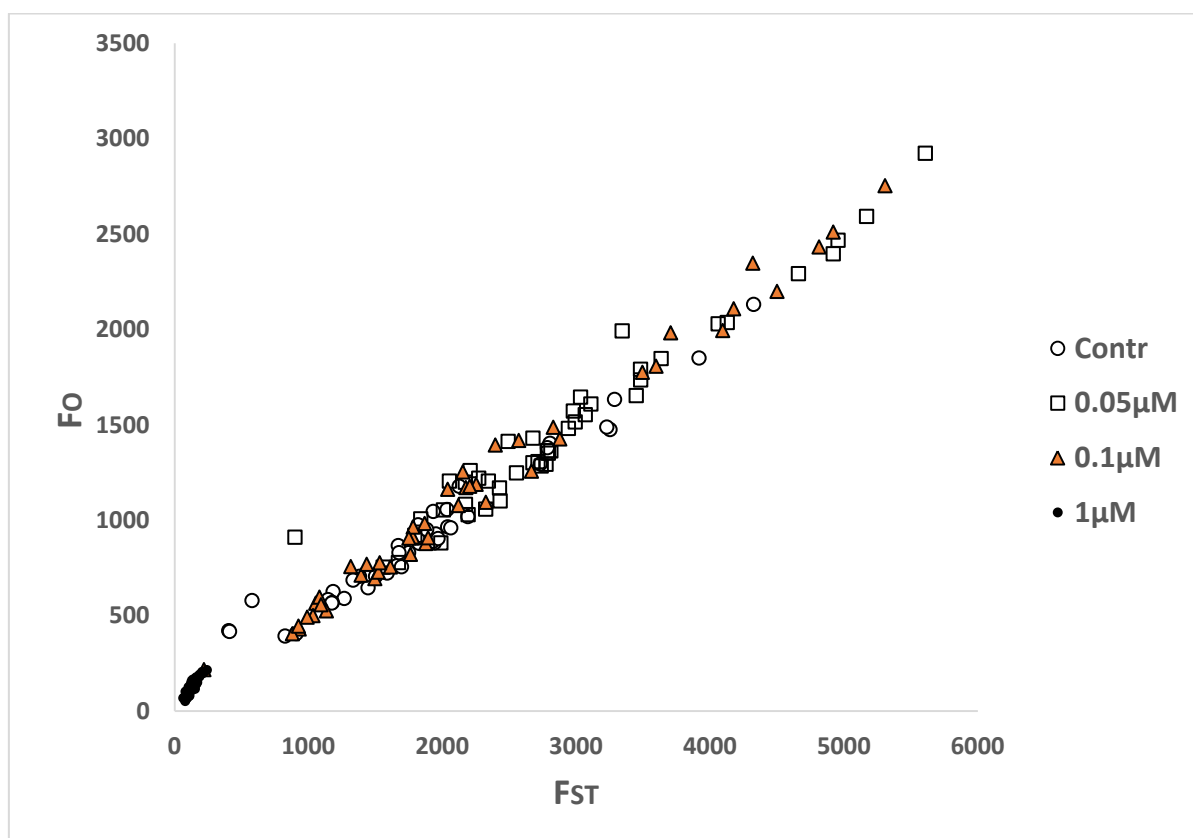


Рис. 4.3.16. Соотношения между интенсивностью максимальной (F_{st}) и интенсивностью минимальной (F_o) флуоресценции клетки в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и

*при действии ионов серебра. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.*

Аналогичный подход, описанный выше мы использовали для измерения флуоресценции на одиночных клетках при их темновой инкубации 24 часа при действии серебра и без него (рис. 4.3.16). Также, как и в световых условиях инкубации мы провели измерения флуоресценции на одиночных клетках, по выявлению их гетерогенность в общей популяции, в том числе и по их чувствительности к, исследуемому токсиканту. Такая гетерогенность, выявляемая по интенсивности флуоресценции одиночных клетках, была нами обнаружена (рис. 4.3.16).

На рисунке 4.3.16 можно увидеть значительную гетерогенность клеток по параметрам минимальной (F_o на клетку) и максимальной (F_{st} на клетку) флуоресценции как в контроле, так и в образцах с содержанием ионов серебра в концентрациях 0,05 и 0,1 мкМ. Однако при концентрации серебра 10мкМ наблюдается только популяция клеток с незначительными значениями (черные точки), близкими к нулю, параметров флуоресценции (F_o и F_{st}). Но в случае темновой инкубации амплитуда колебаний изменений этих параметров была несколько выше чем для случая световой инкубации, т.е. присутствует некоторое распределение по величине, исследуемых параметров, но незначительное.

Для случая темновой инкубации нами также были рассчитаны средние на клетку значения F_o и F_{st} по данным FRR-микрофлуориметрии (рис. 4.3.17). Также удельные показатели на одну клетку изменяются в опыте гораздо сильнее, чем те же показатели в расчете на единицу поглощенной энергии для суспензии клеток (Рис. 4.3.15 А, В, 24ч), что также указывает на потенциально более высокую чувствительность флуориметрии одиночных клеток и в этой серии экспериментов. В этом конкретном случае удельные значения F_o и F_{st} в зависимости от концентрации серебра изменялись немонотонно (рис. 4.3.17).

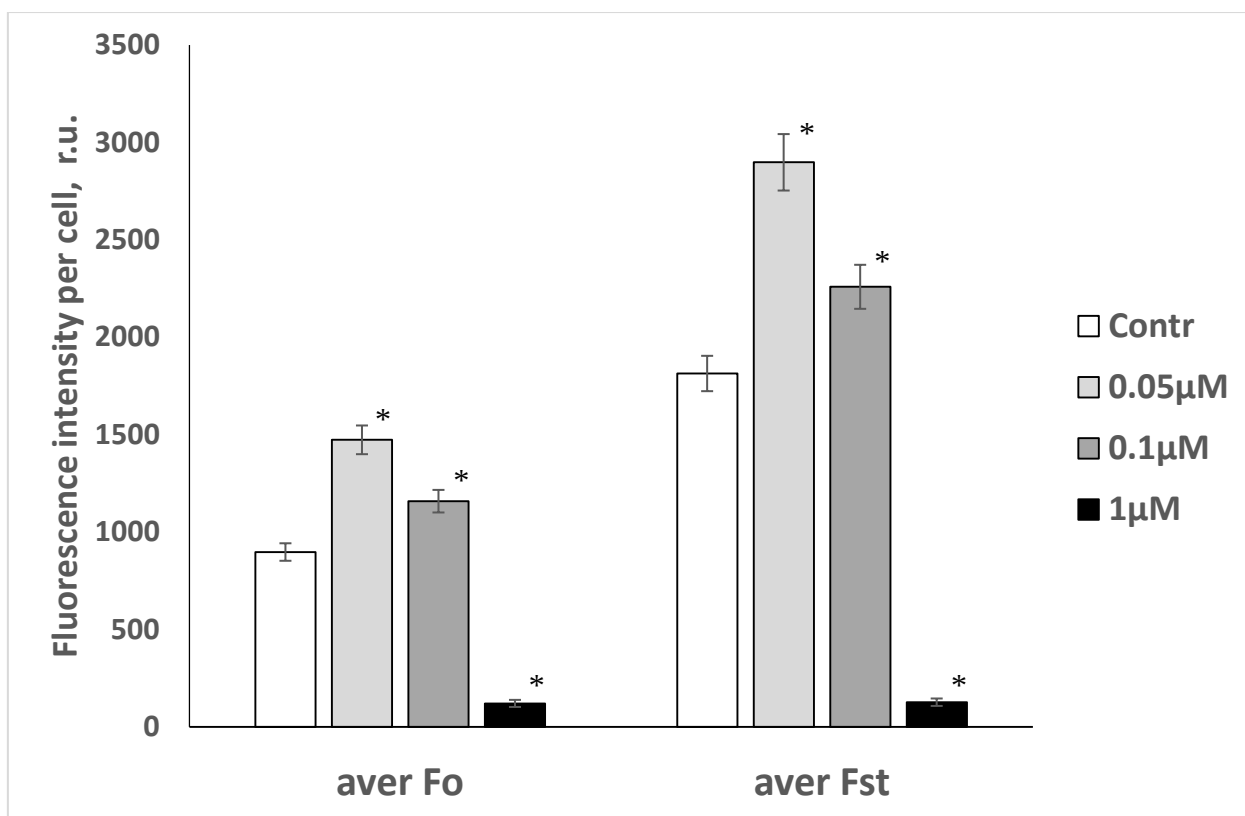


Рис. 4.3.17. Средние значения минимальной (F_o) и максимальной (F_{st}) флуоресценции на одну клетку культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии серебра. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

В концентрации 0,05 и 0,1 мкМ было зафиксировано увеличение F_o и F_{st} , а при большей концентрации 1 мкМ значительное уменьшение относительно контроля, почти до нулевого уровня (Рис. 4.3.17). При этом эффект снижения параметров F_o и F_{st} при действии серебра в максимальной концентрации выражен несколько меньше по сравнению с таковым при световой инкубации клеток (Рис. 4.3.7). Но следует отметить, что эффект увеличения параметров F_o и F_{st} при действии серебра в наименьшей, исследованной концентрации (0,05 мкМ) в условиях темновой инкубации значительно и достоверно отличается по отношению к контролю. При увеличении концентрации до 0,1 мкМ выраженность такого эффекта увеличения, исследуемых параметров падает. Таким образом действие серебра в наименьшей концентрации 0,05 мкМ на параметры F_o и F_{st} проявляется в виде гормезиса, механизмы которого еще предстоит исследовать в дальнейшем.

Также, как и в предыдущих разделах результаты регистрации флуоресценции на отдельных клетках представлены в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} (рис. 4.3.18).

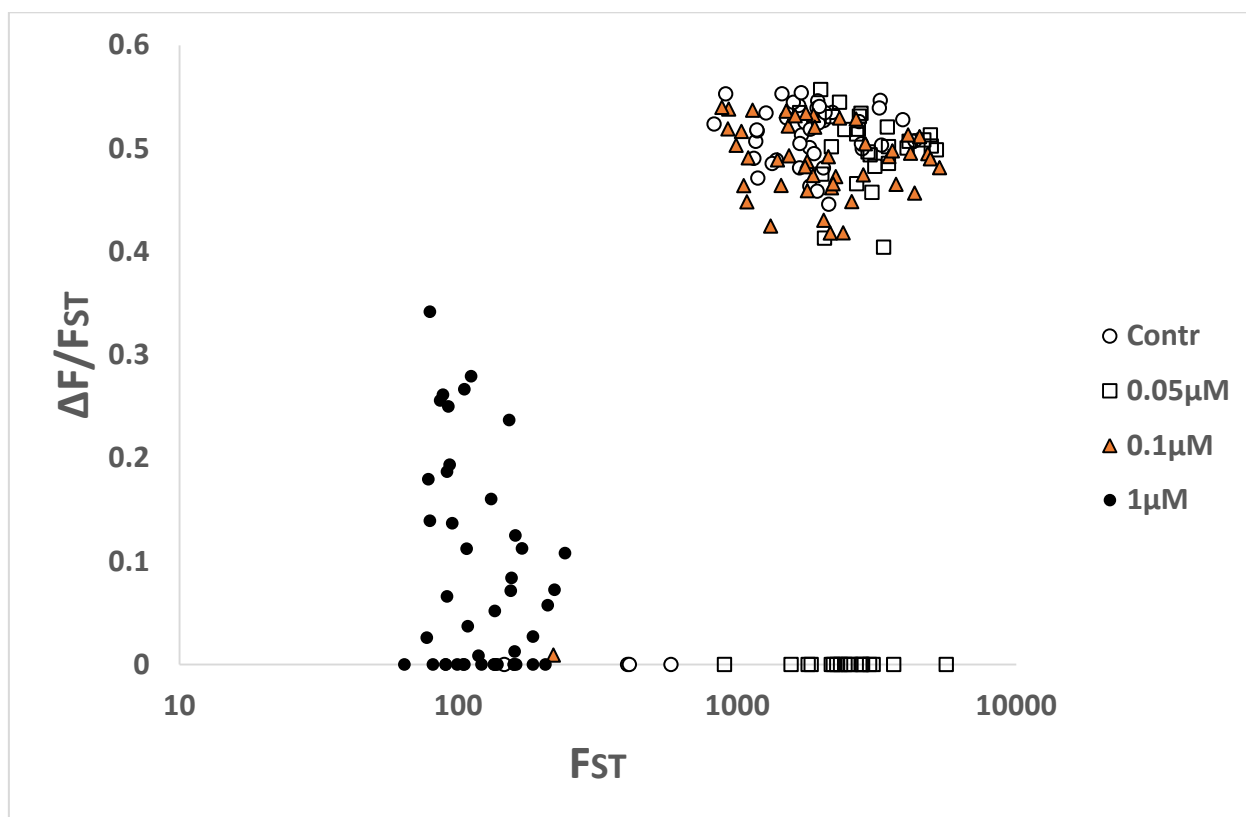


Рис. 4.3.18. Соотношения между интенсивностью максимальной флуоресценции клетки (F_{st}) и фотохимическим квантовым выходом ФСП ($\Delta F/F_{st}$) в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии серебра. Максимальная флуоресценция клетки (F_{st}) представлена в логарифмических координатах. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света.

Регистрация флуоресценции на одиночных клетках после 24 часовой инкубации в темноте также выявляет неоднородность реакции клеток на действие серебра в условиях темновой инкубации, в особенности при действии этого агента в максимальной, исследуемой концентрации 1 мкМ. Так, наблюдается распределение клеток в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} (рис. 4.3.18, черные точки), в котором мы условно можем выделить три кластера, как и в случае световой инкубации (рис. 4.3.8, черные точки), но «средний» и «нижний» кластеры сливаются в одну общую область (рис. 4.3.18), максимальное

значение параметра $\Delta F/F_{st}$ клеток во всей области в два раза меньше чем таковое при световой инкубации, а интервал значений $\Delta F/F_{st} - 0-0,34$.

Клетки образцов соответствующих, контролю и концентрации серебра – 0,05 и 0,1 мкМ при условиях 24 часовой темновой инкубации расположены кучно в одной относительно небольшой области поля с координатами $\Delta F/F_{st}$. При этом у популяции клеток соответствующей пробе с концентрацией серебра – 0,05 мкМ и в контрольной пробе выделяется малочисленные субпопуляции со значением параметра $\Delta F/F_{st}$ равном нулю. При этом максимальные значения параметра F_{st} во всех трех образцах (кроме 1 мкМ) не превышает 5310, что на 40% ниже чем таковое при световой инкубации. Таким образом воздействие света и ионов серебра вызывает большую гетерогенность клеток в координатах $\Delta F/F_{st}$ и F_{st} чем в случае инкубации в отсутствии освещения. Возможно это связано с активизацией у части клеток репарационных процессов именно в световых условиях инкубации.

Также, как и в экспериментах при 24 часовой световой инкубации микроводорослей были рассчитаны средние значения по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII $\Delta F/F_{st}$ и в случае 24 часовой темновой инкубации. В контрольных условиях среднее по клеткам значение фотохимического квантового выхода ФСII (параметр $\Delta F/F_{st}$) составило около 0,47 (рис.4.3.19), что заметно меньше, чем значение F_v/F_m (0,74), полученное стандартно при измерениях в суспензии клеток (рис. 4.3.14, 24ч). Эта разница имеет систематический характер и обусловлена различным состоянием закрытых реакционных центров в тот момент, когда фиксируется максимальная флуоресценция (single turnover state vs multiple turnover state).

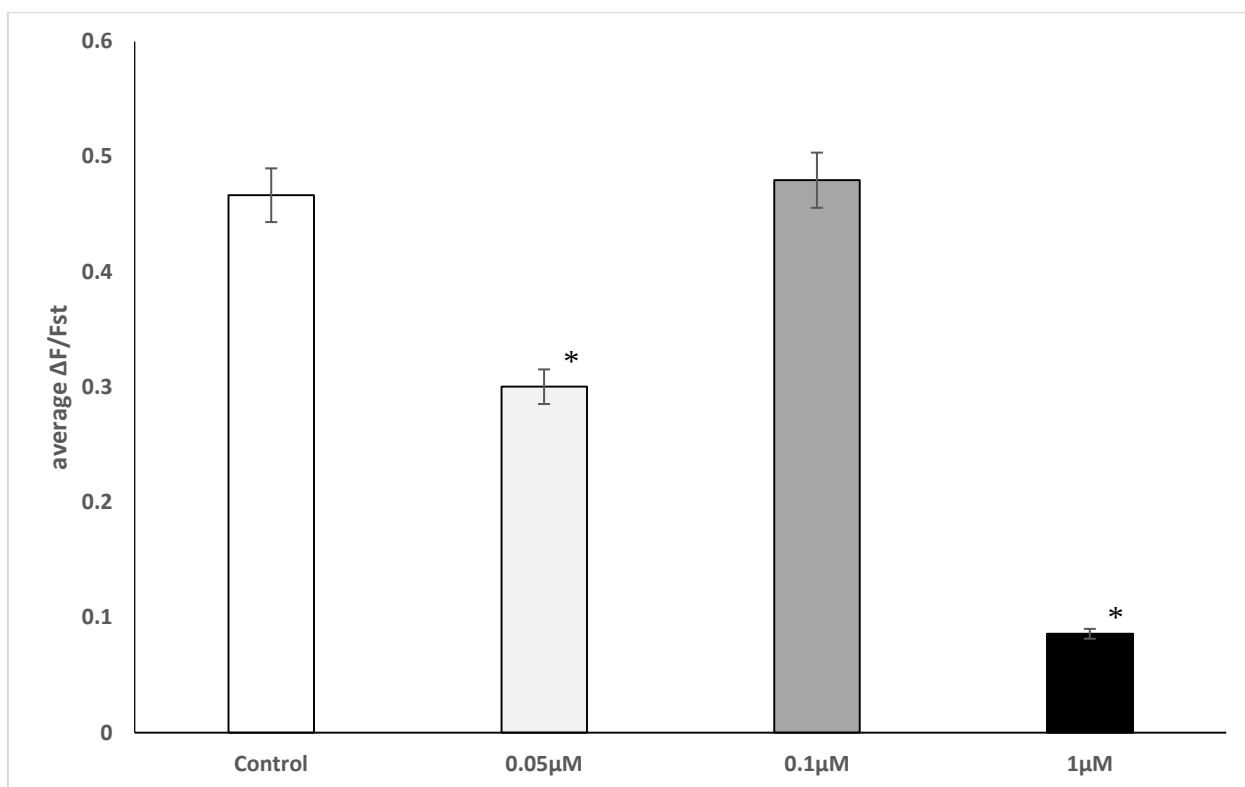


Рис. 4.3.19. Значения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии серебра. Инкубация клеток до начала измерения проводилась 24 ч в отсутствии света. * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

При добавлении серебра в разных концентрациях изменения $\Delta F/F_{st}$ на индивидуальных клетках (рис. 4.3.19 значительно более выражены, чем изменения значений F_v/F_m , полученных стандартно при измерениях в суспензии клеток (рис. 4.3.14, 24ч). Особенно сильное различие наблюдается при действии малой и средней концентрации серебра (0,05 и 0,1 мкМ соответственно).

При темновых условиях инкубации, по данным микрофлуориметрии мы также выявили различные аспекты действия серебра на популяцию клеток, которые не доступны методу регистрации флуоресценции в суспензии и обнаружили гетерогенность популяции клеток по их чувствительности к действию этого токсиканта. При этом в случае темновой инкубации особая гетерогенность наблюдалась при действии низкой концентрации серебра

(0,05 мкМ). При этом следует обратить внимание на отсутствие монотонности снижения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII - $\Delta F/F_{st}$ при темновой инкубации (рис. 4.3.19), в отличие от такового при световой (рис. 4.3.9). При этом это совершенно было не очевидно при измерении на суспензиях клеток (рис. 4.3.14).

И в этом случае микрофлуориметрический подход оказался более точным и информативным.

Также, как и в случае с медью при световой инкубации (рис. 4.2.10) и темновой (рис. 4.2.20) и в случае световой инкубации с серебром (рис. 4.3.10), для большей наглядности результаты измерений $\Delta F/F_{st}$ на клетках при действии серебра в условиях темновой инкубации были представлены в виде гистограмм распределения (рис. 4.3.20).

Также, как и в предыдущих случаях весь диапазон измеренных значений $\Delta F/F_{st}$ разделен на три области: область низких (0 – 0,2), средних (0,2-0,4) и высоких (>0,4) значений.

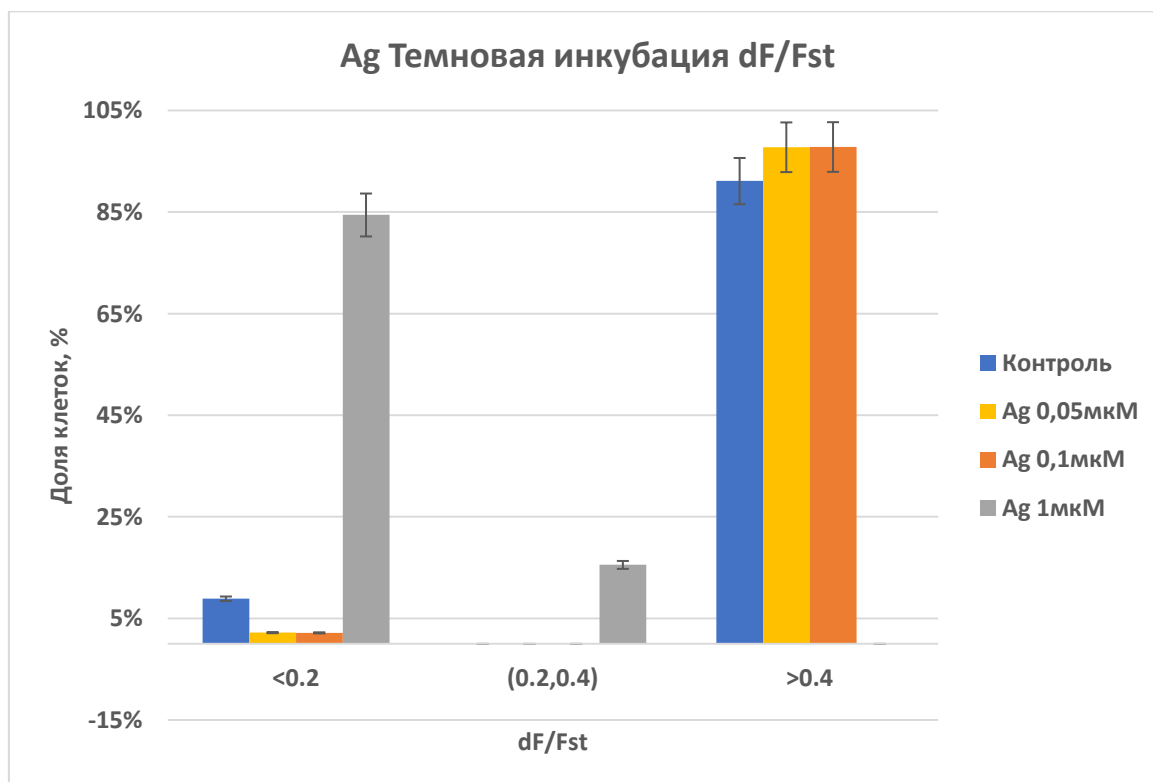


Рис. 4.3.20. Гистограммы распределения одиночных клеток по фотохимической активности ФСII. По оси абсцисс — относительная

переменная флуоресценция ($\Delta F/F_{st}$); по оси ординат — доля клеток в %. Инкубация клеток в контроле и с ионами серебра до начала измерения проводилась в течение 24 ч в отсутствии освещения.

На рис. 4.3.20 видно, что в контроле и при концентрациях серебра 0,05 и 0,1 мкМ основная доля клеток в популяции попадает в область и «высокой» активности ФСII. При этих концентрациях серебра лишь незначительная доля клеток попадает в область «низкой» активности ФСII. Это согласуется и с другими данными для действия серебра на клетки в условиях темновой инкубации полученными на одиночных клетках. С увеличением концентрации серебра до 1 мкМ распределение клеток смещается в сторону «средней» и «низкой» категории. При этом в области низкой категории оказывается 85% клеток из популяции. Тем не менее и в этом случае метод микрофлуориметрии оказывается более информативным по сравнению с методом измерения в суспензии и выявляет гетерогенность клеточной популяции.

4.3.7. Особенности действия серебра на индукцию быстрой флуоресценции в клетках культуры микроводоросли *S. quadricauda*. OJIP-кривые и их параметры

В этом разделе исследовано влияние ионов серебра в концентрациях 0,05, 0,1, и 1 мкМ в течении 24 часов световой и темновой инкубации на индукцию быстрой флуоресценции культуры микроводоросли *S. quadricauda* по сравнению с таковой в контроле (концентрация меди - 0).

Как видно из представленного рисунка 4.3.21, ионы серебра в концентрациях 0,05 и 0,1 мкМ после 24-ч инкубации приводили к незначительному тушению флуоресценции хлорофилла. Тогда как, при этих же концентрациях после 2-х часовой инкубации при непрерывном освещении мы наблюдали увеличение амплитуд ΔJ и ΔI (данные не представлены), свидетельствующие о нарушении электронного транспорта на уровнях Q_A и PQ пула (Strasser R.J. et al, 2004; Антал Т.К., и др. 2009). В темновых же условиях после 2-х часовой инкубации в данных концентрациях наблюдали незначительное увеличение только ΔI . Отсутствие же эффектов увеличения ΔJ и ΔI через 24 ч в присутствии серебра в концентрациях 0,05 и 0,1 мкМ, по-

видимому, связано с восстановлением фотосинтетической активности и детоксикацией *S. quadricauda*, возможно в результате частичного абсорбирования ионов серебра в клеточной стенке микроводорослей (Zümriye Aksu, 1998).

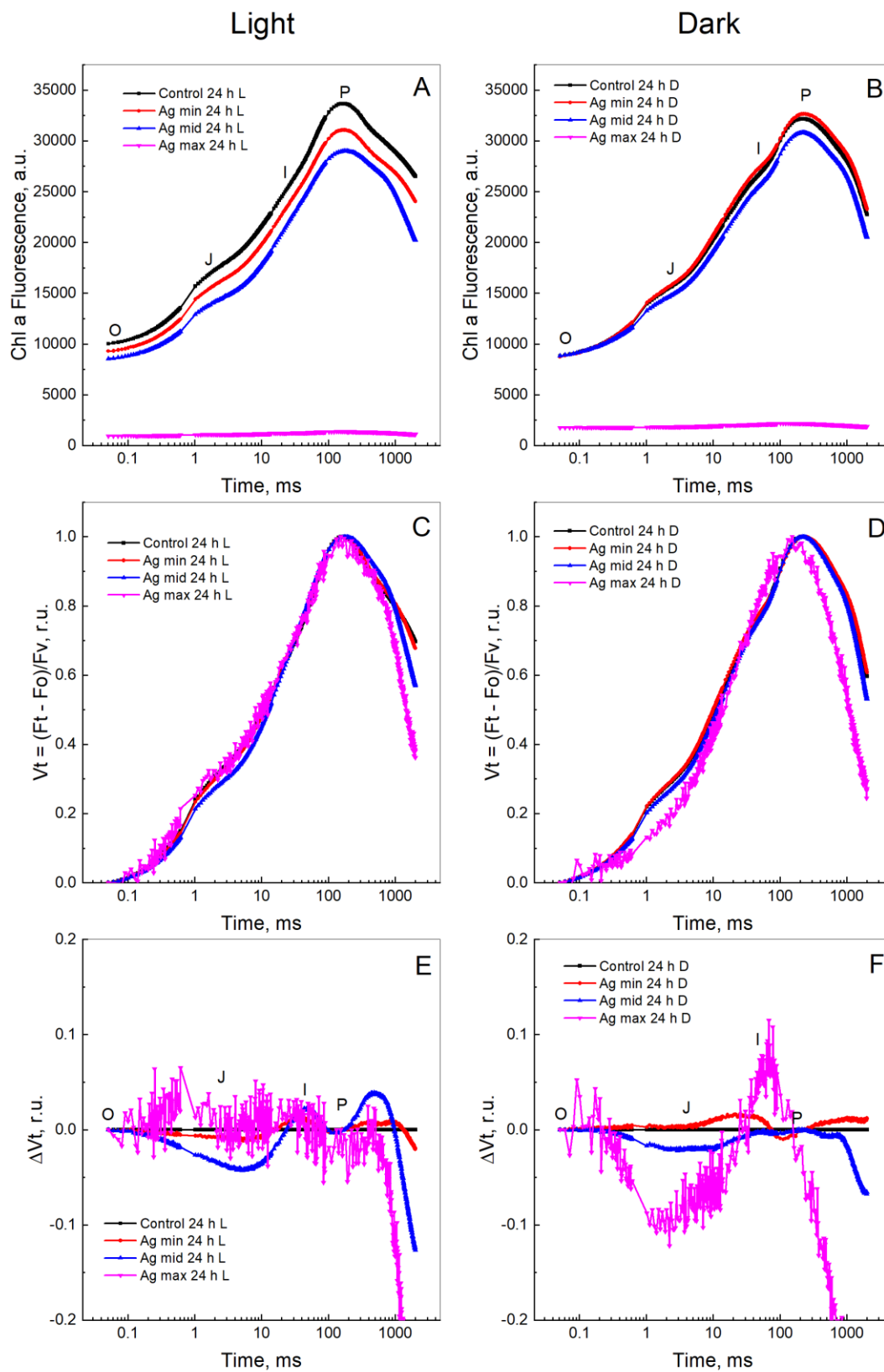


Рис. 4.3.21. Индукционные кривые флуоресценции Хл а культуры микроводоросли *S. quadricauda* после 24 ч воздействия AgNO_3 в концентрациях 0 (контроль), 0,05, 0,01 и 1 мкМоль/л в световых условиях при $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (А, С, Е) и при выключенном свете (В, D, F). Ненормированные ОЖР-кривые (А, В), ОЖР-кривые нормированы на начальную (при 50 мкс) и максимальную интенсивности флуоресценции и представлены в виде $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$ (С, D) и разности значений функций $\Delta V_t = (V_{t(\text{серебро})} - V_{t(\text{контроль})})$ (Е, F).

Ионы серебра в максимальной концентрации оказывали ингибирующее воздействие на *S. quadricauda* как в световых, так и в темновых условиях, что проявлялось в значительном уменьшении интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем во всех фазах индукционных кривых флуоресценции (Рис. 4.3.21 А, В). Нормирование кривых на уровни F_0 и F_m и последующие вычитание из кривых при контроле показало, что при действии серебра (1 мкМ) наблюдали уменьшение амплитуд фаз J и I, вероятной причиной которого является ингибирование ЭТЦ на донорной стороне ФСII (рис. 4.3.21 Е, F).

Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла анализировали с помощью ЖР-теста для того, чтобы выявить количественные изменения в функциональном состоянии ФСII и электроном транспорте за ее пределами.

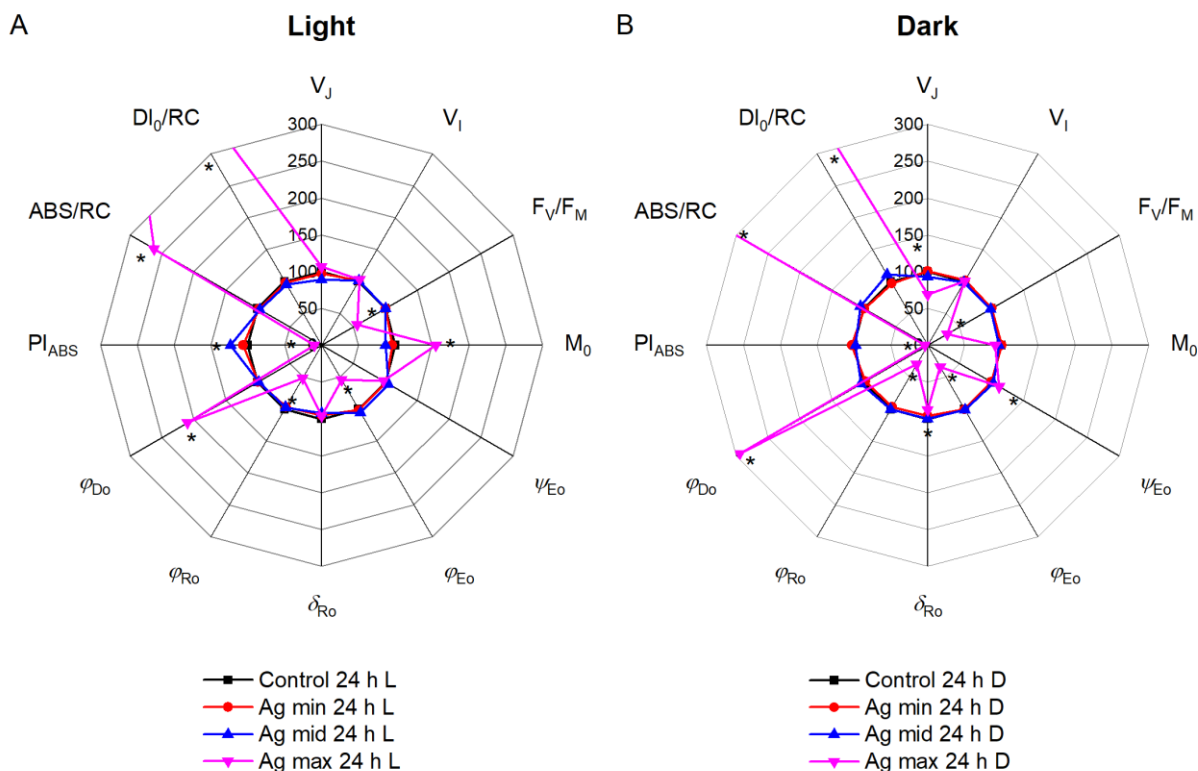


Рис. 4.3.22. Параметры флуоресценции JIP-теста, представлены в виде процента от контроля, где контроль = 100 %. *S. quadricauda* после 24-х часовой инкубации с AgNO_3 в концентрациях 0 (контроль), 0,05, 0,1 и 1 μM в световых условиях при $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) и при выключенном свете (B). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

На рис. 4.3.22 представлены параметры флуоресценции JIP-теста в процентах от контроля.

Как видно из представленного рисунка, ионы серебра в максимальной концентрации вызывали значительное ингибирование фотосинтетических процессов, что проявлялось в снижении квантового выхода ФСII (F_V/F_M) на ~50% и параметра PI_{ABS} , характеризующего функциональную активность ФСII через параметры F_V/F_M , ψ_{E_0} и ABS/RC . Существенные изменения в PI_{ABS} обусловлены, главным образом, уменьшением доли активных РЦ в связи с этим обнаружено увеличение размера антенны на активный РЦ (ABS/RC). В световых условиях инкубации при воздействии соли меди выявлено увеличение скорости закрывания РЦ в результате ограничения электронного

транспорта между Q_A и Q_B (увеличение M_0). При повреждении фотосинтезирующих мембран ионами серебра в высокой концентрации поглощенная энергия не использовалась на фотохимию, а расходовалась на тепловые потери. Об этих процессах свидетельствует значительное увеличение квантовой эффективности диссипации поглощенной энергии (ϕ_{Do}) и рассеяния поглощенной энергии в тепло на активный РЦ (Dl_0/RC) в присутствии ионов серебра. При этом в темновых условиях токсические эффекты были выражены в большей степени, о чем свидетельствуют существенные изменения в параметрах F_v/F_m , ABS/RC , Dl_0/RC и ϕ_{Do} .

Таким образом, соли серебра в концентрациях 0,05 и 0,1 мкМ в первые 2 часа инкубации вызывали частичное нарушение в ЭТЦ микроводорослей, а при 24 часах происходило адаптационное восстановление этого процесса. Но в световых условиях инкубации имело место некоторое дозависимое снижение флуоресценции во всех фазах индукционных кривых (рис.4.3.21 А). При концентрации серебра 1 мкМ происходит значительное ингибирование фотосинтетической активности, что проявлялось в снижении всех узловых фаз индукционных кривых, квантового выхода ФСII (F_v/F_m) и увеличения диссипации поглощенной энергии в тепло (Dl_0/RC и ϕ_{Do}). Причем токсический эффект был более выражен в темновых условиях инкубации.

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

На рис. 4.3.23 представлены световые кривые линейного электронного транспорта и нефотохимического тушения.

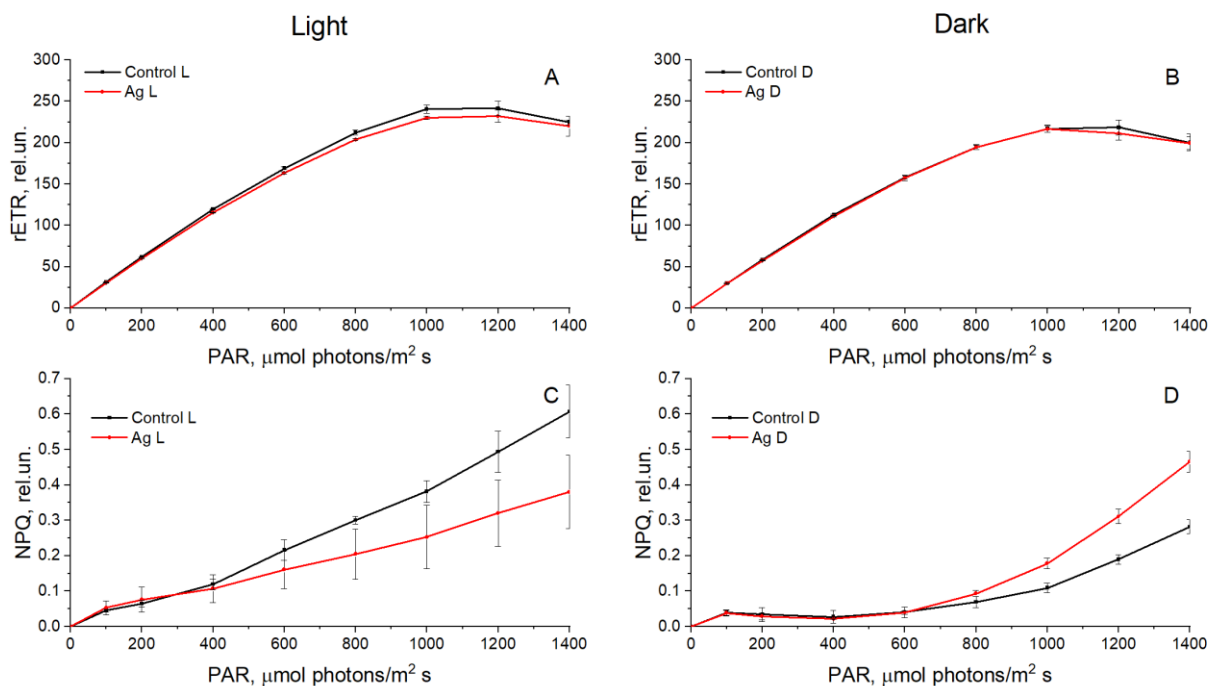


Рис. 4.3.23. Быстрые световые кривые относительного линейного электронного транспорта (rETR) (A, B) и нефотохимического тушения (NPQ) (C, D) *S. quadricauda* после 24-х часовой инкубации с серебром в концентрации 0,1 мкМ в световых условиях при $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (A, C) и при выключенном свете (B, D).

Из рисунка 4.3.23 видно, что серебро в концентрации 0,1 мкМ оказывают незначительное воздействие на скорость нециклического электронного транспорта, тогда как в концентрации в 10 раз выше (1 мкМ) мы отмечали полное ингибирование фотосинтетических процессов причем как в темновых, так и в световых условиях (данные не представлены из-за сильного подавления процессов и поэтому перекрывания приборными шумами полезного сигнала). Световые же кривые нефотохимического тушения для контроля в световых условиях были выше, чем в темновых, что подтверждает то, что механизмы NPQ в значительной степени активируются на свету. В исследуемых концентрации серебро не вызывало значимого воздействия на NPQ в световых условиях, однако, в темновых условиях выявлено увеличение NPQ при действии серебра в данной концентрации (4.3.23 D). Что показывает большее влияние на NPQ серебра в темновых условиях инкубации.

4.3.9. Влияние серебра на параметры кривых затухания флуоресценции в пико- и наносекундном диапазоне в суспензии клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda*

Также, как и для меди в разделе 4.2.9. в этом разделе нашей экспериментальной работы мы приводим результаты анализа кривых затухания флуоресценции Хл *a* клеток *S. quadricauda* в контрольном образце и в образце в присутствии серебра в концентрации 1 мкМ после 24 часовой инкубации в световых и темновых условиях. Также для анализа кривых затухания мы использовали двухэкспоненциальное приближение для каждого образца, которое дает 4 величины – два характерных времени (τ_1 и τ_2), и две предэкспоненты («амплитуды», A_1 и A_2), описанные в разделе 4.2.9.

Усредненные по повторностям результаты измерений по кривым затухания флуоресценции в суспензии представлены в таблице 4.3.1. Поскольку параметры A_1 и A_2 линейно зависят от содержания пигментов в образцах, а содержание это изменялась от образца к образцу, для корректного сравнения мы сразу приводим нормированные значения амплитуд (A_1^* и A_2^*) на единицу поглощенного возбуждающего света на длине волны возбуждения 455нм:

$$A_1^* = A_1/D_{455},$$

$$A_2^* = A_2/D_{455}.$$

Здесь мы приводим только результаты для серебра в максимальной, исследованной концентрации 1 мкМ, так как по предварительным измерениям (данные не представлены) эффекты более низких концентраций были пренебрежимо малыми, а полноценное измерение сигналов с математической и статистической обработкой потребовало бы значительного времени.

Таблица 4.3.1. Значение параметров кривых затухания флуоресценции в суспензии S. quadricauda после 24 часовой инкубации в темновых и световых условиях в контроле и в присутствии серебра в концентрации 1 мкМ.

Образец	τ_1 , нс	τ_2 , нс	A_1^* , отн. ед.	A_2^* , отн. ед.	$A_1^* \cdot \tau_1$	$A_2^* \cdot \tau_2$	доля медленной компоненты
Контроль Темновая инкубация	0,447	1,165	87,0	108,7	39	127	0,77
Контроль Световая инкубация	0,426	1,030	84,0	138,8	36	143	0,80
Ag 1 мкМ Темновая инкубация	0,179	1,208	106,5	31,9	19	39	0.67
Ag 1 мкМ Световая инкубация	0,096	0,826	58,4	40,5	6	33	0.86

В таблице 4.3.1 представлены данные результаты только при самой большой из исследованных нами концентраций серебра (1 мкМ) в сравнении с контрольным образцом.

Вклад рекомбинационной компоненты, как и в опыте с медью, велик. Поэтому по условиям измерений эти данные ближе к состоянию закрытых РЦ (и в контроле, и при действии серебра).

По сравнению с медью, где в основном менялись амплитуды, здесь видно значительное изменение времени жизни быстрой компоненты. Оно уменьшается при инкубации с токсикантом в темноте в 2,5 раза, а на свету – почти в 4,5 раза. Это говорит о сильном динамическом тушении возбуждения в антенном комплексе. Это может быть катион радикал P_{680}^+ , который накапливается при ингибировании (повреждении) водоразлагающего комплекса.

Общая площадь под кривой затухания ($A_1^* \cdot \tau_1 + A_2^* \cdot \tau_2$) при действии серебра уменьшалась в 3 раза от контрольного значения при инкубации в темноте и более чем в 4 раза при инкубации на свету. Это согласуется с тем как уменьшается величина удельной максимальной флуоресценции на приборе AquaRep и максимальная флуоресценция на клетку по данным микрофлуориметра (F_{st}).

Время жизни медленной компоненты τ_2 не изменялось при инкубации клеток с серебром в темноте, но сокращалось в полтора раза при инкубации

на свету, что позволяет предположить фотоокислительный характер повреждения реакционного центра ФСII с увеличением в нем константы безызлучательных потерь энергии.

Таким образом для серебра мы наблюдаем тушение по динамическому и статическому механизмам.

4.3.10. Обобщение результатов по действию серебра на первичные фотосинтетические процессы у пресноводных микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* с помощью методов регистрации флуоресценции хлорофилла при культивации водорослей с ионами серебра в темновых и световых условиях.

Таким образом проведенное исследование влияния ионов Ag^+ на первичные процессы фотосинтеза пресноводных микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* выявило ряд важных аспектов воздействия этого токсиканта на фотосинтетический аппарат клеток.

При концентрациях Ag^+ 0,05 и 0,1 мкМ не наблюдалось значительных изменений в содержании хлорофилла и каротиноидов. При концентрации Ag^+ 1 мкМ отмечено существенное снижение содержания обоих типов пигментов, причем каротиноиды оказались более устойчивыми к повреждению. В световых условиях эффект снижения содержания пигментов был более выражен, что может указывать на возможное усиление генерации АФК в присутствии ионов серебра на свету.

Выявлены изменения в параметрах флуоресценции. Относительная переменная флуоресценция (F_v/F_m) в суспензии клеток показала значительное снижение при концентрации Ag^+ 1 мкМ, особенно в темновых условиях. Измерения на отдельных клетках выявили более сложную картину изменений фотохимического квантового выхода ФСII ($\Delta F/F_{st}$) при действии Ag^+ , включая эффекты гормезиса при низких концентрациях.

Выявлена гетерогенность в ответе на воздействия в популяции микроводорослей. Измерения на отдельных клетках показали значительное увеличение гетерогенности популяции по параметрам флуоресценции при

действии серебра. При концентрации 1 мкМ Ag^+ наблюдалось разделение популяции на несколько групп с различной интенсивностью флуоресценции и фотохимическим квантовым выходом. Эта гетерогенность была более выражена в световых условиях, что может указывать на различную способность клеток справляться с окислительным стрессом.

Выявлено влияние серебра на электронный транспорт. Анализ ОЖР-кривых выявил значительные изменения в форме кривых при действии Ag^+ в концентрации 1 мкМ. Наблюдалось снижение квантового выхода ФСII (F_v/F_m) и параметра PIABS, характеризующего функциональную активность ФСII. Увеличение параметров M_0 , Dl_0/RC и ϕDo свидетельствует о нарушении электронного транспорта и увеличении тепловой диссипации энергии.

Выявлены различия между световыми и темновыми условиями инкубации клеток. В целом, токсическое действие Ag^+ было более выраженным в темновых условиях. Это может быть связано с тем, что в световых условиях активируются защитные механизмы, в частности, механизмы нефотохимического тушения (NPQ). Однако при высоких концентрациях Ag^+ (1 мкМ) световые условия усиливали токсический эффект, возможно, из-за усиления генерации АФК.

Выявлены изменения в кинетике затухания флуоресценции. Наблюдалось значительное уменьшение времени жизни быстрой компоненты затухания флуоресценции, особенно в световых условиях. Это указывает на сильное динамическое тушение возбуждения в антенном комплексе, возможно, связанное с накоплением катион-радикала P680^+ . Общая площадь под кривой затухания уменьшалась в 3-4 раза при действии Ag^+ , что согласуется с данными по снижению максимальной флуоресценции. По анализу данных кривых затухания можно сказать, что серебро вызывает как динамическое, так и статическое тушение.

При сравнении действия Ag^+ с действием Cu^{2+} , обнаруживается более выраженный токсический эффект Ag^+ по сравнению с Cu^{2+} при одинаковых концентрациях.

В отличие от Cu^{2+} , Ag^+ вызывает значительные изменения во времени жизни флуоресценции, что указывает на различные механизмы токсического действия этих металлов.

В целом, результаты исследования демонстрируют, что Ag^+ оказывает многоплановое воздействие на фотосинтетический аппарат *S. quadricauda*, затрагивая различные аспекты его функционирования. Особенно важным является выявление гетерогенности ответа популяции на действие токсиканта и различий в эффектах при световых и темновых условиях, что подчеркивает необходимость комплексного подхода к оценке экологических рисков, связанных с загрязнением водной среды ионами серебра.

4.4. Изучение влияния ионов меди и серебра на клетки *Scenedesmus quadricauda* с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света

Нами были определены спектры комбинационного рассеяния одиночных клеток *Scenedesmus quadricauda* при использовании синего возбуждающего $\lambda_{\text{max}}=488$ нм.

На рисунке 4.4.1 показаны спектры комбинационного рассеяния одиночных клеток *Scenedesmus quadricauda* в контроле и после 24-х часовой инкубации с ионами меди в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ, полученные с помощью конфокального РАМАН микроскопа.

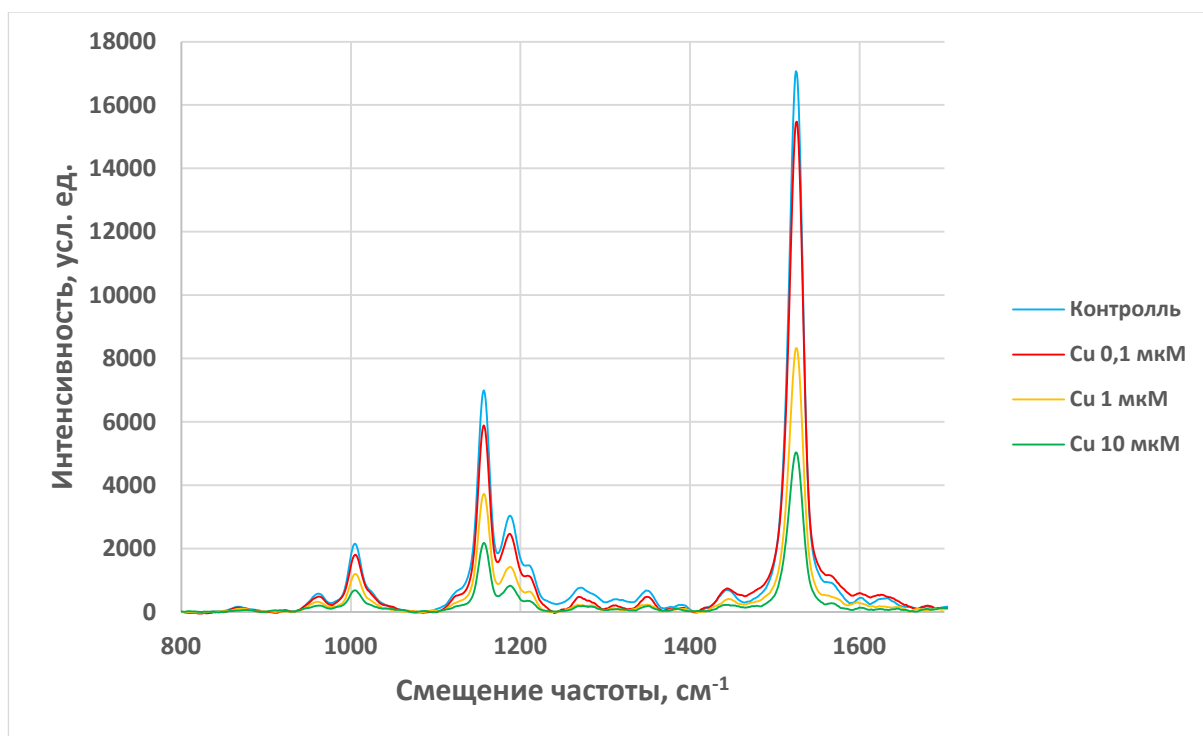


Рис. 4.4.1. Спектры комбинационного рассеяния *Scenedesmus quadricauda*, в контроле и после 24 ч инкубации с CuSO_4 , Длина волны лазера 488 нм. По оси абсцисс – смещение частоты излучения (Раман сдвиг) в см^{-1} ; по оси ординат – интенсивность излучения в условных единицах.

Из рисунка видно, что *Scenedesmus quadricauda* имеет три основные полосы комбинационного рассеяния с максимумами в 1006, 1158 и 1526 см^{-1} , что соответствует основным каротиноидным полосам комбинационного рассеяния, которые обычно преобладают в микроводорослях по сравнению с полосами других пигментов (Kateřina Osterrothová et al, 2019). Также наблюдаются дополнительные каротиноидные пики меньшей интенсивности в полосах с максимумами в областях 964 и 1190 см^{-1} . Наблюдаемые пики комбинационного рассеяния соответствуют следующим колебательным модам химических связей: 1006 см^{-1} (C=CH), 1158 см^{-1} (C-C), 1527 см^{-1} (C=C), 964 см^{-1} (колебания СН группы вокруг C-C связи) и 1190 см^{-1} (предположительно изменения положения метила C16) (Тютяев Е.В., и др. 2015).

Из рисунка видно, что при действии меди наблюдается дозависимое снижение интенсивности всех каротиноидных пиков. Такое снижение

указывает на снижение содержание каротиноидов при действии меди во всех концентрациях. Использование метода комбинационного рассеяния указывает на его большую чувствительность по сравнению с применяемым выше методом абсорбционной спектроскопии. Так методом абсорбционной спектроскопии мы не могли наблюдать снижение содержание каротиноидов в суспензиях клеток при действии меди в концентрациях 0,1 и 1 мкМ (рис.4.2.2).

Применяя аналогичный подход, мы исследовали влияние ионов серебра на спектры комбинационного рассеяния *Scenedesmus quadricauda* (рис.4.4.2).

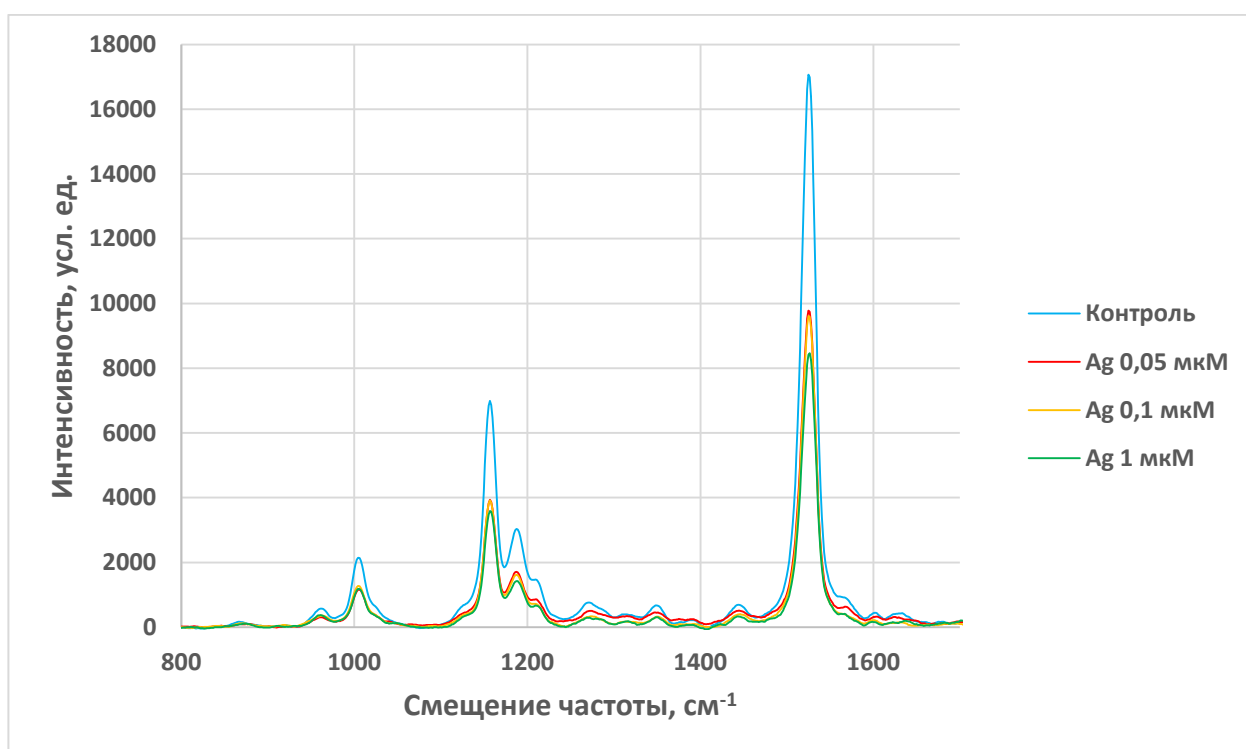


Рис. 4.4.2. Спектры комбинационного рассеяния *Scenedesmus quadricauda*, в контроле и после 24 ч инкубации с AgNO_3 , Длина волны лазера 488 нм. По оси абсцисс – смещение частоты излучения (Раман сдвиг) в см^{-1} ; по оси ординат – интенсивность излучения в условных единицах.

При действии серебра также наблюдается дозозависимое снижение интенсивности всех пиков спектров комбинационного рассеяния на каротиноидах одиночных клеток *Scenedesmus quadricauda* по сравнению с контролем. При этом при минимальной концентрации серебра 0,05 мкМ наблюдается значительное, почти в два раза снижение интенсивности

излучения (рис.4.4.2), тогда как минимальная концентрация меди 0,1 мкМ вызывает снижение интенсивности примерно на 10%. Эти данные также указывают на более значительную токсичность серебра даже при меньших концентрациях.

4.5. Исследование влияния ионов меди и серебра на морфологию клеточной стенки микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* с помощью метода сканирующей электронной микроскопии

Исследовано влияние ионов меди и серебра на морфологию клеточной стенки микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* после их 24-х часовой инкубации с помощью метода электронной сканирующей микроскопии (СЭМ). С помощью метода СЭМ были получены микрофотографии *Scenedesmus quadricauda* в контроле и при действии ионов меди в концентрации 1 мкМ и серебра в концентрации 0,5 мкМ (рис. 4.5.1).

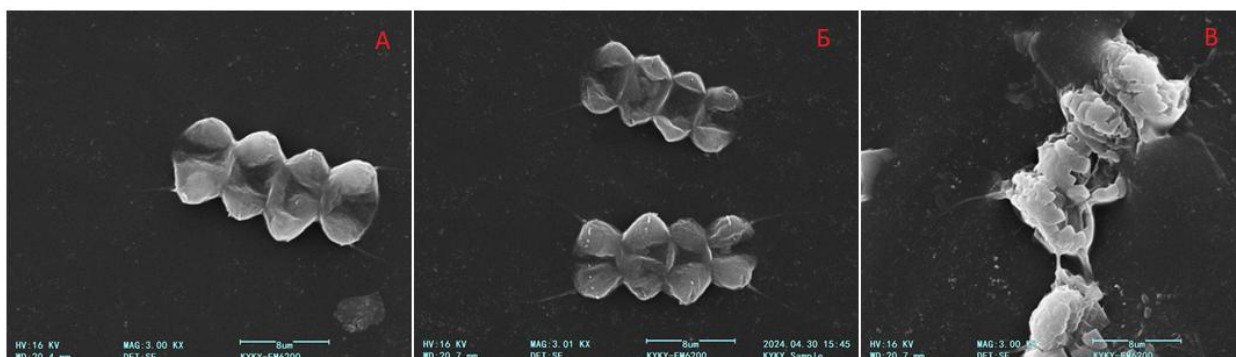


Рис.4.5.1. Электронная микрофотография, полученная с помощью метода СЭМ клеток *Scenedesmus quadricauda* после инкубации в контрольных условиях (А), а также после 24-х часовой инкубации с ионами Cu^{2+} в конечной концентрации 1 мкМ (Б) и ионами Ag^+ в конечной концентрации 0,5 мкМ (В).

Из рисунка видно, что при действии меди в концентрации 1 мкМ в течение 24 часов не наблюдается значительного изменения морфологии клеточной стенки клеток *Scenedesmus quadricauda* по сравнению с контролем. При действии ионов серебра в концентрации 0,5 мкМ наблюдается разрушение клеточной стенки. Нам представляется, что наиболее вероятным

механизмом такого разрушения является индуцированное ионами серебра увеличение активных форм кислорода (Фастовец И.А. и др., 2017).

Полученные данные также показывают различия в морфологической реакции клеточной стенки *Scenedesmus quadricauda* меди и ионов серебра. Отсутствие выраженных изменений в морфологии клеточной стенки при воздействии меди в концентрации 1 мкМ указывает на относительную устойчивость клеточной оболочки к данному токсиканту, по крайней мере в течение 24 часов воздействия. При действии же серебра в концентрации 0,5 мкМ наблюдаются существенные повреждения клеточной стенки, указывающее на высокую чувствительности клеток к ионам Ag^+ .

Одним из ключевых механизмов токсичности ионов серебра считается индукция окислительного стресса в клетках, приводящего к накоплению активных форм кислорода (АФК), которые, в свою очередь, способны повреждать биомембраны и клеточные стенки. Это было показано в ряде исследований, где воздействие ионов Ag^+ на микроорганизмы сопровождалось генерацией АФК и последующим разрушением клеточной структуры (Fastovets et al., 2017; Le Ouay & Stellacci, 2015). Учитывая, что клеточная стенка водорослей состоит из полисахаридных и белковых компонентов, АФК могут вызывать повреждение клеточной оболочки за счёт окисления белков, дестабилизации структурных компонентов клеточной стенки и разрушения сопряжённой с ней плазматической мембраны.

Кроме того, ионы серебра способны связываться с тиольными группами белков и ферментов, нарушая их функцию и вызывая структурные изменения в клетках (Morones et al., 2005). Деструкция клеточной стенки может также быть связана с нарушением осмотического баланса и проницаемости мембран.

В отличие от серебра, медь обладает двойственным действием: с одной стороны, она участвует в ряде метаболических процессов как кофактор, с другой — может проявлять токсичность в высоких концентрациях. Однако при низких концентрациях, таких как 1 мкМ, в клетках *Scenedesmus*

quadricauda, возможна, активация антиоксидантных механизмов защиты, включая активацию антиоксидантных ферментов (Beatrycze Nowicka, 2022).

Таким образом, наблюдаемые морфологические изменения подтверждают более выраженное токсическое действие ионов Ag^+ по сравнению с ионами Cu^{2+} и подчёркивают необходимость дальнейших исследований молекулярных механизмов повреждения клеточной оболочки и адаптационных ответов фотосинтезирующих организмов на действие тяжёлых металлов.

4.6. Влияние ионов меди и серебра на индукцию быстрой флуоресценции в клетках культуры цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC6803. OJIP-кривые

Так как, как указывалось выше, индукционные кривые флуоресценции хлорофилла фотосинтезирующих водных микроорганизмов представляют собой своеобразные «отпечатки пальцев», отражающие их функциональное состояние, особенно под действием стрессорных факторов, использование данного метода является особенно целесообразным при сравнении токсического воздействия этих факторов на организмы с разной устойчивостью, принадлежащие к различным таксономическим группам водных экосистем.

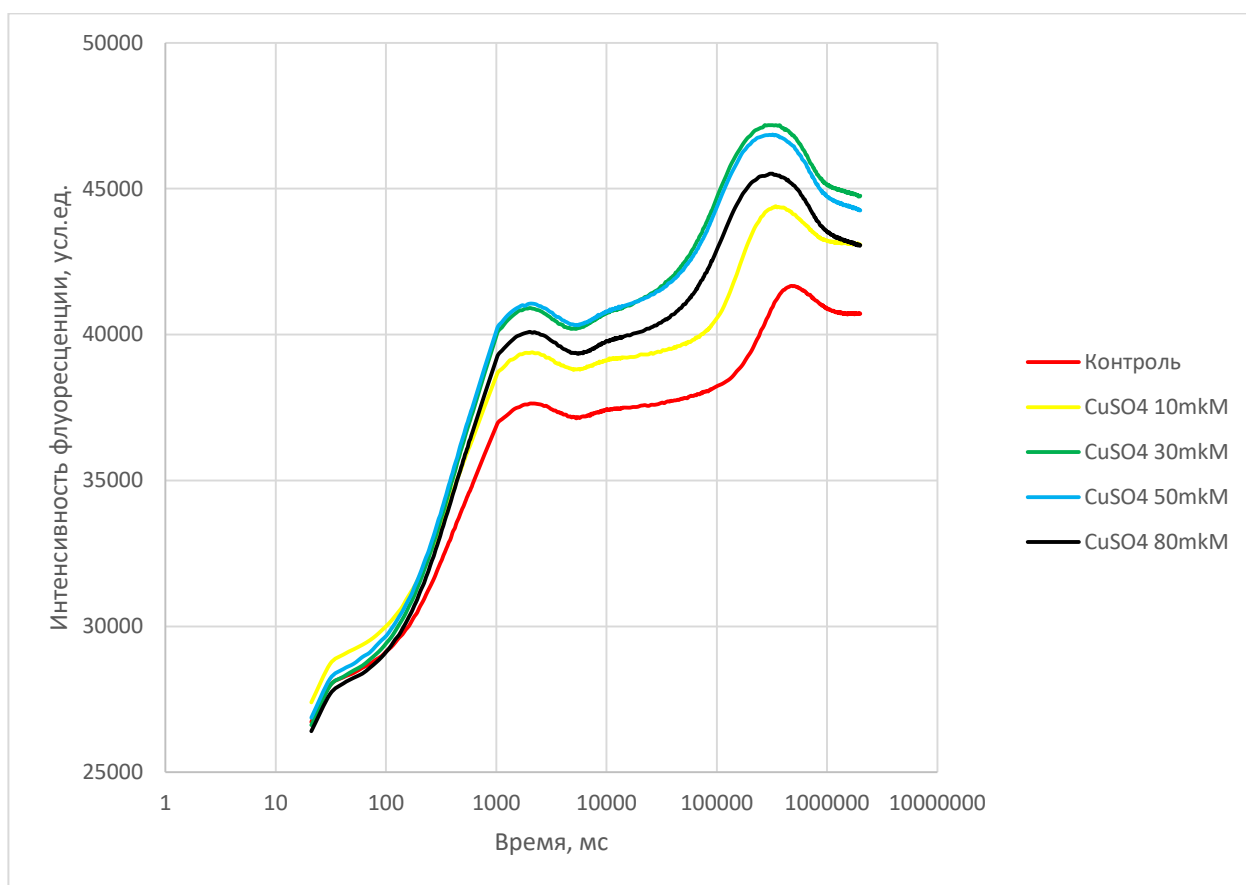
В этом разделе работы мы исследовали влияние ионов меди и серебра на характер OJIP-кривых в суспензиях культуры цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803. По предварительной оценке, предполагалось, что цианобактерии обладают большей устойчивостью к различным стрессорным факторам, в том числе к тяжёлым металлам.

По результатам предварительных экспериментов выяснилось, что при концентрациях меди и серебра, токсичных для микроводорослей, цианобактерии сохраняют высокую устойчивость. В связи с этим в следующей серии экспериментов концентрации обоих металлов были увеличены, но остались в микромолярном интервале.

На рисунке 4.6.1 представлены данные по влиянию ионов меди на

индукционные ОЛР-кривые флуоресценции суспензии клеток культуры цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803 по сравнению с контролем.

Из рисунка видно, что медь вызывает дозависимое 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.4.6.1. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛР) культуры *Synechocystis* sp. PCC6803, измеренные после 24 ч инкубации в присутствии соли меди (CuSO_4). Интенсивность возбуждающего света $1500 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при длине волны — $\lambda=620 \text{ нм}$, после 5 минут темновой адаптации. По оси абсцисс — время, в микросекундах. По оси ординат, интенсивность флуоресценции, условных единиц.*

Из рисунка также видно, что при максимальной концентрации меди — 80 мкМ происходит некоторое снижение параметров флуоресценции, по

сравнению с предыдущими концентрациями (50 и 30 мкМ,) которое может говорить о том, что при этой концентрации начинается некоторое незначительное выцветание хлорофилла.

На рисунке 4.6.2 представлены данные по влиянию ионов серебра на индукционные OJIP-кривые флуоресценции суспензии клеток культуры цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803 по сравнению с контролем.

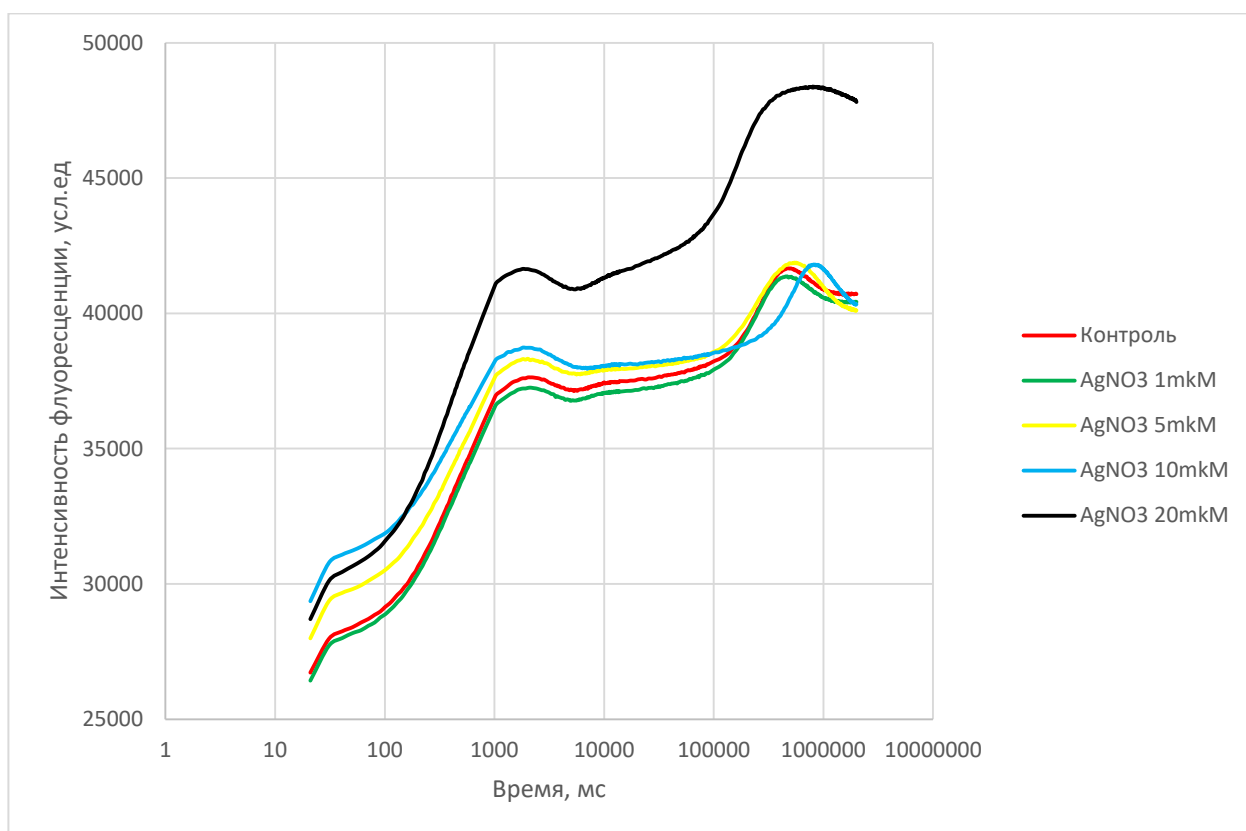


Рис.4.6.2. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (OJIP) культуры *Synechocystis* sp. PC6803, измеренные после 24 ч инкубации в присутствии соли серебра (AgNO_3). Интенсивность возбуждающего света $1500 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при длине волны – $\lambda=620 \text{ нм}$, после 5 минут темновой адаптации. По оси абсцисс - время, в микросекундах. По оси ординат, интенсивность флуоресценции, условных единицах.

Из рисунка видно, что значительное увеличение параметров флуоресценции без выцветания хлорофилла наблюдался только при действии наибольшей исследованной концентрации 20 мкМ. При действии

концентраций серебра – 1, 5 и 10 мкМ не сопровождается значительным изменением величин узловых точек индукционных кривых флуоресценции, что указывает на устойчивость цианобактерий к серебру в этих концентрациях. Следует также отметить, что из рисунка видно, что при действии серебра происходит дозозависимое увеличение уровня флуоресценции в точке – О. Это факт может указывать на нарушение передачи возбужденного состояния из светособирающего комплекса в реакционный центр.

Таким образом цианобактерия *Synechocystis sp. PCC 6803* проявляет значительно более высокую устойчивость к действию тяжёлых металлов по сравнению с микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*, что указывает на существенные видовые различия в адаптационных стратегиях фотосинтезирующих организмов к металл-индуцированному стрессу, что может иметь большое экологическое значение.

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

5. Заключение

Результаты проведённого 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.

6. 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 OJIP-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 OJIP. При действии меди (10 мкМ) наибольшее снижение пиков OJIP 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 - $1400 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ 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 тилакода при ингибировании ФСII замедляется, полученные данные говорят о накоплении протонов в результате замедления их выхода в строму через хлоропластную АТФ синтетазу.

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*. ОЖР 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.

7. Список сокращений и условных обозначений

АФК – Активные формы кислорода

КВК – кислород-выделяющий комплекс

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

Пц – пластоцианин

РЦ - Реакционные центры

ССК – светособирающий комплекс

ФСА - Фотосинтетический аппарат

ФСМ - Фотосинтетические мембраны

ФСІ - Фотосистема І

ФСІІ - Фотосистема ІІ

Цит. b_6/f -комплекс – комплекс цитохромов b_6/f или
пластохинолпластоцианинредуктаза.

ЭТЦ – Электрон транспортная цепь

P680 – РЦ ФСІІ

P700 – РЦ ФСІ

QA – первичный стабильный хинонный акцептор в ФСІІ

QB – вторичный хинонный акцептор в ФСІІ

8. Список цитируемой литературы

1. Антал Т.К., Граевская Е.Э., Маторин Д.Н., Волгушева А.А., Осипов В.А., Кренделева Т.Е., Рубин А.Б. Исследование влияния ионов метилртути и меди на первичные процессы фотосинтеза у зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* с использованием параметров кинетических кривых переменной флуоресценции хлорофилла. Биофизика. 2009; 54(4). С. 681–687.
2. Вишняков А.Н., Давыдова Н.С., Стравинскене Е.С., Григорьев Ю.С. Биодоступность ионов меди в водах различного происхождения. ПОВОЛЖСКИЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. 2016. № 2. С. 123 – 130.
3. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР. М.: Советская наука, 1953. Вып. 2. 652 с.
4. Гольцев В.Н., Каладжи Х.М., Паунов М., Баба В., Хорачек Т., Мойски Я., Коцел Х., Аллахвердиев С.И. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений // ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2016, том 63, № 6, с. 881–907.
5. Заядан Б.К., Садвакасова А.К., Маторин Д.Н. Биоремедиация и мониторинг загрязненных водных экосистем на основе микроводорослей. Москва. Альтекс. 2020. ISBN 978-5-93121-460-3. 274с.
6. Зинченко В.В., Глазер В.М., Кряжов С.В., Лучкин П.В., Бабыкин М.М., Белавина Н.В., Лось Д.А. Создание коллекций мутантов для исследования генетического контроля адаптации к стрессовым факторам у *Synechocystis* sp. PCC 6803. // Экологическая генетика. 2008. 6(3):33–41.
7. Клементьев К.Е. Влияние высокоэнергетических частиц на первичные процессы преобразования энергии в фотосинтетическом аппарате цианобактерий. Автореф. канд. дисс., Москва, МГУ, 2019, 25 с.
8. Кондратьева Е.Н. Автотрофные прокариоты. М.: Изд-во МГУ, 1996. 312 с.

9. Лось Д.А. Сенсорные системы цианобактерий. М. 2010. 217 с.
10. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. Методика измерения обилия и индикации изменений состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом теоретические и практические аспекты. Москва. Альтекс. 2012. ISBN 978-5-93121-304-0. 138с.
11. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла. Учебно-методическое пособие. Москва-2010. ISBN 978-5-317-03315-6. 116с.
12. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей // М.: 2012. 256 с.
13. Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов: Учебник в 3-х томах. Том 1. СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та. 2006. 352 с.
14. Погосян С.И., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Проблемы экологической биофизики. –М. – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2017. – ISBN 978-5-4344-0452-5. 272с. 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>.
15. Полозова Е.В., Шилов В.В., Богачева А.С., Ключкин И.Н. Перспективы использования цианобактерий *Synechocystis* sp. для оценки степени загрязненности водных объектов солями тяжелых металлов. // Гигиена и санитария. 2017. 96(7):656-660. DOI: .
16. Тодоренко Д.А., Маторин Д.Н., Алексеев А.А., Тунгатарова Д.И. Изучение токсичности сульфата меди и наночастиц серебра с использованием флуоресценции микроводорослей *scenedesmus quadricauda* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. — 2014. — № 1. — С. 25–32.
17. Тютяев Е.В., Шутова В.В., Максимов Г.В., Раденович Ч.Н., Гродзинский Д.М. Состояние фотосинтетических пигментов в листьях

инбредных линий и гибридов кукурузы. // Физиология растений и генетика. 2015. Т. 47. № 2. С.147-159.

18. Фастовец И.А., Верховцева Н.В., Пашкевич Е.Б., Нетрусов А.И. Наночастицы серебра: Токсическое действие на микроорганизмы и взаимодействие с высшими растениями. // Проблемы агрохимии и экологии, 2017, № 1. С.51-62.

19. Федеральный реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03223, <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293842/4293842245.htm>

20. Филенко О.Ф. Основы водной токсикологии/ О.Ф. Филенко, И.В. Михеева. – М.: Колос, 2007.–144с.

21. Филенко, О. Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды / О. Ф. Филенко // Экологические системы и приборы. – 2007. – №6. – С. 18-20.

22. A Barylа, C Laborde, J.-L Montillet, C Triantaphylidès, P Chagvardieff. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper. // Environmental Pollution. 2000. Vol. 109, Issue 1, July, Pages 131-135

23. Ahamed, M., AlSalhi, M. S., & Siddiqui, M. K. J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. Clinica Chimica Acta, 411(23–24), 1841–1848.

24. Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. Journal of Chemistry, 2019, Article ID 6730305.

25. Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals: Concepts and applications. Chemosphere, 91(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>

26. Alkhamis, Y. A., Mathew, R. T., Nagarajan, G., Rahman, S. M., & Rahman, M. M. (2022). pH induced stress enhances lipid accumulation in microalgae grown under mixotrophic and autotrophic condition. Frontiers in Energy Research, 10, 1033068. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.1033068>

27. Allakhverdiev, E.S.; Khabatova, V.V.; Kossalbayev, B.D.; Zadneprovskaya,

E.V.; Rodnenkov, O.V.; Martynyuk, T.V.; Maksimov, G.V.; Alwasel, S.; Tomo, T.; Allakhverdiev, S.I. Raman Spectroscopy and Its Modifications Applied to Biological and Medical Research. *Cells* 2022, 11, 386.

28. Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., & Mohanty, P. (2008). Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98(1), 541–550. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0>

29. Anderson S.L., McIntosh L. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. // *Journal of Bacteriology*. 1991. 173(9): 2761–7. doi:10.1128/jb.173.9.2761-2767.1991.

30. Andrews, T. J., & Lorimer, G. H. (1975). Factors affecting interconversion between kinetic forms of ribulose diphosphate carboxylase-oxygenase from spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 171(1), 93–103. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90011-9)

31. Angela Mehta, Luis López-Maury, Francisco J Florencio. Proteomic pattern alterations of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to cadmium, nickel and cobalt. // *ournal of Proteomics*. 2014. 102. DOI:10.1016/j.jprot.2014.03.002.

32. Antal T., Rubin A. In vivo analysis of chlorophyll a fluorescence induction // *Photosynth. Res.* 2008. V. 96. P. 217 – 226.

33. Atkins, P., & de Paula, J. (2006). *Physical chemistry* (8th ed.). Oxford University Press.

34. Baird, D. J., & Van den Brink, P. J. (2007). Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(2), 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.07.001>

35. Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., & Smith, J. A. C. (2000). Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In R. R. Brooks & C. D. Dunn (Eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (pp. 85–

107). CRC Press.

36. Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>

37. Baranska, M.; Roman, M.; Majzner, K. General Overview on Vibrational Spectroscopy Applied in Biology and Medicine. In *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*; Baranska, M., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2014; pp. 3–14.

38. Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Miranda-Vergara, M. C., & Pantoja, O. (2014). Quantitative proteomics of heavy metal exposure in *Arabidopsis thaliana* reveals alterations in one-carbon metabolism enzymes upon exposure to zinc. *Journal of Proteomics*, 111, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.006>

39. Beatrycze Nowicka. Heavy metal–induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. // *Environmental Science and Pollution Research* (2022) 29:16860–16911. .

40. Bergey's manual of systematic bacteriology / Boone R., Castenholz R.W. (eds). New York: Springer, 2012.

41. Berry, J. A., & Bjorkman, O. (2003). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 491–543. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.002423>

42. Blankenship R.E. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Malden, MA: Blackwell Science Inc. 2002.

43. Blankenship, R. E. (2002). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470758472>

44. Born, M.; Bradburn, M. The theory of the Raman effect in crystals, in particular rocksalt. *Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.* 1947, 188, 161–178.

45. Britt, A. B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 75–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.75>

46. Byamba, T., Hasegawa, K., & Maeda, I. (2022). Removal of Pb(II) from

aqueous solution by a pectin-producing alga, *Penium margaritaceum*, immobilized on filter paper. *Microbiology Research*, 13(4), 1007–1017.

47. C. Esther Elizabeth Grace, Srisudha S., Sakthieaswari P., M. Briget Mary, Vaidyanathan Seetharaman. Sensitivity of Ftir and Raman Spectroscopy to Detect Changes in Pigment Accumulation in Microalgae Due to Nutrient Variation. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=5061186> or . Posted: 17 Dec 2024. 29 Pages.

48. Cairns, J. (1994). *Rehabilitating damaged ecosystems* (2nd ed.). CRC Press.

49. Cambien, N., Gobeyn, S., Nolivos, I., Forio, M. A. E., Arias-Hidalgo, M., Dominguez-Granda, L., Witing, F., Volk, M., & Goethals, P. L. M. (2020). Using the Soil and Water Assessment Tool to simulate the pesticide dynamics in the data scarce Guayas River Basin, Ecuador. *Water*, 12(3), 696. <https://doi.org/10.3390/w12030696>.

50. Carpenter, S. R. (1996). Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology*, 77(3), 677–680. <https://doi.org/10.2307/2265490>

51. Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2), 121–137.

52. Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., & Allen, H. E. (1998). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: Binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(10), 2221–2243.

53. Cheloni, G., & Slaveykova, V. I. (2018). Combined effects of trace metals and light on photosynthetic microorganisms in aquatic environment. *Environments*, 5(7), 81.

54. Chen, S., Zhang, W., Yang, J., & Li, X. (2019). Effects of atrazine on growth and oxidative stress of *Scenedesmus quadricauda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 299–306.

55. Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of

gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12(10), 444–451.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.07.002>

56. Choudhury, S. R., & Das, T. (2012). DNA damage and repair in environmental toxicity assessment—A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 741–754.

57. Chug R., Mathur S. Extracellular polymeric substances from cyanobacteria: characteristics, isolation and biotechnological applications – a review // *International Journal of Advances in Engineering, Science and Technology (IJAEST)*. 2013. 3(2):49–53.

58. Ciscato, M., Vangronsveld, J. and Valcke, R. "Effects of Heavy Metals on the Fast Chlorophyll Fluorescence Induction Kinetics of Photosystem II: a Comparative Study" *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 54, no. 9-10, 1999, pp. 735-739. <https://doi.org/10.1515/znc-1999-9-1019>.

59. Clements, W. H., & Rohr, J. R. (2009). Community responses to contaminants: Using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1789–1800.
<https://doi.org/10.1897/09-140.1>

60. Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159–182.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>

61. Cockell, C. S., & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews*, 74(3), 311–345.
<https://doi.org/10.1017/S0006323199005356>

62. Cramer, W. A. (2019). Structure-function of the cytochrome b6f lipoprotein complex: a scientific odyssey and personal perspective. *Photosynthesis Research*, 139(1-3), 53–65. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0585-x>

63. Croce, R., & van Amerongen, H. (2014). Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 492–501.

64. Daneshvar, E., Ok, Y. S., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong,

H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., & Bhatnagar, A. (2021). Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329, 124870.

65. Dao, L., & Beardall, J. (2020). Effects of heavy metals on the growth and photosynthesis of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19, 697–719.

66. Darvin and, M.E. Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2005(1), 38, 2696.

67. Darvin, M.E.; Gersonde, I.; Albrecht, H.; Gonchukov, S.A.; Sterry, W.; Lademann, J. Determination of Beta Carotene and Lycopene Concentrations in Human Skin Using Resonance Raman Spectroscopy. *Laser Phys.* 2005, 15, 295–299.

68. Darvin, M.E.; Lademann, J.; von Hagen, J.; Lohan, S.B.; Kolmar, H.; Meinke, M.C.; Jung, S. Carotenoids in Human Skin in vivo: Antioxidant and Photo-Protectant Role against External and Internal Stressors. *Antioxidants* 2022, 11, 1451.

69. David Fuente, Dusan Lazar, Jose Vicente Oliver-Villanueva & Javier F. Urchueguía. Reconstruction of the absorption spectrum of *Synechocystis* sp. PCC 6803 optical mutants from the in vivo signature of individual pigments. // *Photosynthesis Research* 2021. November. Volume 147, pages 75–90.

70. De Philippis R., Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications // *FEMS Microbiol. Rev.* 1998. 22:151–175.

71. DeAngelis, D. L., & Waterhouse, J. C. (1987). Equilibrium and nonequilibrium concepts in ecological models. *Ecological Monographs*, 57(1), 1–21. <https://doi.org/10.2307/1942636>.

72. Dewez, D. Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions/ D. Dewez, A. Oukarroum // *Toxicological & Environmental Chemistry* – V.94 – №8 – 2012. – P.1536–1546.

73. Dhanani, T.; Dou, T.; Biradar, K.; Jifon, J.; Kurouski, D.; Patil, B.S. Raman Spectroscopy Detects Changes in Carotenoids on the Surface of Watermelon Fruits during Maturation. *Front. Plant Sci.* 2022, 13, 832522.
74. Dong G., Golden S.S. How a cyanobacterium tells time. // *Current Opinion in Microbiology*. 2008. 11(6): 541–6. doi:10.1016/j.mib.2008.10.003.
75. Dudgeon, D. (2010). Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: Linking ecosystem structure and function. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2(5–6), 422–430. .
76. Elena Cavalletti, Giovanna Romano, Fortunato Palma Esposito, et al. (2022) Review Copper Effect on Microalgae: Toxicity and Bioremediation Strategies. *Toxics* 10, 527.
77. Elyssa G. Fawaz, Lina A. Kamareddine, Darine A. Salam (2019) Effect of algal surface area and species interactions in toxicity testing bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 174, 584-591.
78. Falkowski, P. (2012). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research*, 39(3), 235–258.
79. Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2007). *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press.
80. Fang, C.; Wu, G. Temporal electronic structures of nonresonant Raman excited virtual states: A case study of ethylene thiourea. *J. Raman Spectrosc.* 2007, 38, 1416–1420.
81. Fastovets I.A., et al. (2017). Oxidative stress in microalgae under heavy metal exposure. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(3), 456–463. .
82. Fernandes, J. C., & Henriques, F. S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57(3), 246–273.
83. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman spectroscopy* (2nd ed.). Academic Press.
84. Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic

components. *Science*, 281(5374), 237–240.

85. Forbes, V. E., & Calow, P. (2002). Species sensitivity distributions revisited: A critical appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8(3), 473–492.

86. Foster E.W., Barton L.L., Johnson G.V. Differential cellular response of *Anabaena variabilis* to iron // *J. Plant Nutr.* 1988. 11: 1193-1203.

87. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2–18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>

88. Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 93–100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>

89. Frank, H.A.; Young, A.; Britton, G.; Cogdell, R.J. (Eds.) *The Photochemistry of Carotenoids*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1999.

90. Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39(8), 1529–1542.

91. Giseli S. Rocha, Christopher C. Parrish, Evaldo L.G. Espíndola (2021) Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae). *Algal Research* 54, 102223.

92. Glatz A., Vass I., Los D.A., Vigh L. The Synechocystis model of stress: From molecular chaperones to membranes // *PI. Physiol. Biochem.* 1999. 37(1):1–12.

93. Gong, H., Tang, Y., Wang, J., Wen, X., Zhang, L., & Lu, C. (2008). Characterization of photosystem II in salt-stressed cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(6), 488–495.

94. Goss, R., & Lepetit, B. (2015). Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology*, 172, 13–32. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004>

95. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence /

Govindjee // *Aust. J. Plant. Physiol.* – 1995. – V.34. – P.1073–1079.

96. Graham, L. E., Graham, J. M., & Wilcox, L. W. (2009). *Algae* (2nd ed.). Benjamin Cummings.

97. Griesse M., Lange C., Soppa J. Ploidy in cyanobacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 2011. 323:124–131.

98. Grimm, V., Berger, U., Bastiansen, F., Eliassen, S., Ginot, V., Giske, J., Goss-Custard, J., Grand, T., Heinz, S. K., Huse, G., Huth, A., Jepsen, J. U., Jørgensen, C., Mooij, W. M., Müller, B., Pe'er, G., Piou, C., Railsback, S. F., Robbins, A. M., ... DeAngelis, D. L. (2005). A standard protocol for describing individual-based and agent-based models. *Ecological Modelling*, 198(1–2), 115–126. .

99. Guasch, H., Admiraal, W., & Sabater, S. (2003). Assessing the ecotoxicology of river periphyton in the field: The use of pollution-induced community tolerance. *Hydrobiologia*, 500(1–3), 267–276. <https://doi.org/10.1023/A:1024638726167>

100. Handy, R. D., von der Kammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., & Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287–314. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8>

101. Hanwant Singh, Deepak Kumar & Vineet Soni (2022) Performance of chlorophyll a fluorescence parameters in *Lemna minor* under heavy metal stress induced by various concentration of copper. *Scientific Reports* 12:10620.

102. Hao Li, JiaqiWang, Enze Zhang, et al. (2022) Cumulative Effects of Physical, Chemical, and Biological Measures on Algae Growth Inhibition. *Water* 14, 877.

103. Hassinen, V. H., Tervahauta, A. I., Schat, H., & Kärenlampi, S. O. (2011). Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*, 13(2), 225–232. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x>

104. Hegewald, E. (1997). Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*. *Algae*, 12(4), 235–246.

105. Heidorn T., Camsund D., Huang H.H., Lindberg P., Oliveira P., Stensjö K., Lindblad P. Synthetic Biology in Cyanobacteria. *Synthetic Biology, Part A. // Methods in Enzymology*. 2011. 497:539–79. doi:10.1016/B978-0-12-385075-1.00024-X.
106. Hessen, D. O., Faerovig, P. J., & Andersen, T. (2002). Light, nutrients, and P:C ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology*, 83(7), 1886–1898. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[1886:LNAPCR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[1886:LNAPCR]2.0.CO;2)
107. Hickey, C. W., & Clements, W. H. (1998). Effects of heavy metals on benthic macroinvertebrate communities in New Zealand streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(11), 2338–2346.
108. Hideg, É., Jansen, M. A. K., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: Inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, 18(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003>
109. Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A., & Hatziolos, M. E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318(5857), 1737–1742. <https://doi.org/10.1126/science.1152509>
110. Hof, M.; Macháň, R. Basics of Optical Spectroscopy. In *Handbook of Spectroscopy*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2014; pp. 31–38.
111. Holden, M. H., Plagányi, É. E., Fulton, E. A., Campbell, A. B., Janes, R., Lovett, R. A., Wickens, M., Adams, M. P., Botelho, L. L., Dichmont, C. M., Erm, P., Helmstedt, K. J., Heneghan, R. F., Mendiolar, M., Richardson, A. J., Rogers, J. G. D., Saunders, K., & Timms, L. (2024). Cost-benefit analysis of ecosystem modeling to support fisheries management. *Journal of Fish Biology*, 104(6), 1667–1674. <https://doi.org/10.1111/jfb.15741>.
112. Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005). Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning

electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag^+ . *Biochemistry*, 44(39), 13214–13223. <https://doi.org/10.1021/bi0508542>

113. Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Víg, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7–8), 1653–1664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012>

114. Huang, Y., Lü, X., & Ma, J. (2014). Toxicity of silver nanoparticles to human dermal fibroblasts on microRNA level. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(11), 3304–3317. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1974>

115. Hui Wang, Ramaraj Sathasivam and Jang-Seu Ki (2017) Physiological effects of copper on the freshwater alga *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae) and its potential use in toxicity assessments. *Algae* 32(2): 131-137.

116. Huryn, A. D., & Benstead, J. P. (2019). Seasonal changes in light availability modify the temperature dependence of secondary production in an Arctic stream. *Ecology*, 100(6), e02690. <https://doi.org/10.1002/ecy.2690>

117. Häder, D. P., Lebert, M., Mercado, J. M., & Salles, S. (2007). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 267–285. <https://doi.org/10.1039/B700020K>.

118. Ishikawa Y., Kawai-Yamada M. Physiological Significance of NAD Kinases in Cyanobacteria // *Front Plant Sci.* 2019. 27(10):847. doi: 10.3389/fpls.2019.00847.

119. J., P. NADPH fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a versatile probe for in vivo measurements of rates, yields and pools // *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1837(6):792-801. doi: 10.1016/j.bbabbio.2014.01.009.

120. Jaeger, D., Pilger, C., Hachmeister, H. et al. Label-free in vivo analysis of intracellular lipid droplets in the oleaginous microalga *Monoraphidium neglectum* by coherent Raman scattering microscopy. *Sci Rep* 6, 35340 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep35340>.

121. Jansen, M. A. K., Gaba, V., & Greenberg, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair, and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3(4), 131–135.
122. Jarnevich, C. S., Young, N. E., Cullinane Thomas, C., Grissom, P., Backer, D., & Frid, L. (2020). Assessing ecological uncertainty and simulation model sensitivity to evaluate an invasive plant species' potential impacts to the landscape. *Scientific Reports*, 10, 19069. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75325-w>.
123. Jehlička, J.; Edwards, H.G.M.; Oren, A. Raman Spectroscopy of Microbial Pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014(1), 80, 3286–3295.
124. Jehlička, J.; Edwards, H.G.M.; Osterrothová, K.; Novotná, J.; Nedbalová, L.; Kopecký, J.; Němec, I.; Oren, A. Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: Implications for astrobiology. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2014(2), 372, 20140199.
125. Jehlička, J.; Osterrothová, K.; Oren, A.; Edwards, H.G.M. Raman spectrometric discrimination of flexirubin pigments from two genera of Bacteroidetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013, 348, 97–102
126. Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255–273.
127. Jozef Kovacik, Borivoj Klejdus, Josef Hedbavny, Martin Backor (2010) Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Plant Science* 178, 307–311
128. Jurado A.S., Santana A.C., Da Costa M.S., Madeira M.C. Influence of Divalent Cations on the Growth and Morphology of *Bacillus stearothermophilus*. // *J. Gen. Microbiol.* 1987. 133:507–513.
129. Kafil, M., Berninger, F., Koutra, E., & Kornaros, M. (2022). Utilization of the microalga *Scenedesmus quadricauda* for hexavalent chromium bioremediation and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 346, 126665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126665>
130. Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A.,

Ferroni, L., Goltsev, V., Guidi, L., Jajoo, A., Li, P., Losciale, P., Mishra, V. K., Misra, A. N., Nebauer, S. G., Pancaldi, S., Penella, C., Pollastrini, M., Suresh, K., Tambussi, E., ... Băba, W. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence: Practical issues. *Photosynthesis Research*, 132(1), 13–66.

131. Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I., & Brestic, M. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research*, 122(2), 121–158.

132. Kaneko T., Nakamura Y., Sasamoto S., Watanabe A., Kohara M., Matsumoto M., et al. Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. // *DNA Research*. 2003. 10(5):221–228. doi:10.1093/dnares/10.5.221. PMID 14686584/

133. Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D. Y., & Guy, C. L. (2004). Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(3), 4159–4168. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052142>

134. Kate Maxwell, Giles N. Johnson, Chlorophyll fluorescence—a practical guide, *Journal of Experimental Botany*, Volume 51, Issue 345, April 2000, Pages 659–668, <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.

135. Kateřina Osterrothová, Adam Culka, Kateřina Němečková, David Kaftan, Linda Nedbalová, Lenka Procházková, Jan Jehlička. Analyzing carotenoids of snow algae by Raman microspectroscopy and high-performance liquid chromatography. // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2019. Apr 5:212:262-271. doi: 10.1016/j.saa.2019.01.013.

136. Kawata, K., Osawa, M., & Okabe, S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science & Technology*, 43(15), 6046–6051. <https://doi.org/10.1021/es900754q>

137. Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K. H., Park, K., Yi, J., & Ryu, D. Y. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human

hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*, 23(6), 1076–1084.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.001>

138. Kolašinac, S. M., Pećinar, I., Gajić, R., Mutavdžić, D., & Dajić Stevanović, Z. P. (2025). Raman spectroscopy in the characterization of food carotenoids: Challenges and prospects. *Foods*, 14(6), 953.

139. Korozi, E., Kefalogianni, I., Tsagou, V., Chatzipavlidis, I., Markou, G., & Karnaouri, A. (2023). Evaluation of growth and production of high-value-added metabolites in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* grown on crude glycerol under heterotrophic and mixotrophic conditions using monochromatic light-emitting diodes (LEDs). *Foods*, 12(16), 3068.

140. Krinsky, N.I.; Mayne, S.T.; Sies, H. (Eds.) *Carotenoids in Health and Disease*; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 2004.

141. Kumar, K. S., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., & Shin, K. H. (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352.

142. Kuznetsov A. G., Konyukhov I. V., Pogosyan S. I., Rubin A. B. Microfluorimeter for studying the state of photosynthetic apparatus of individual cells of microalgae // *Oceanology*. — 2021. — Vol. 61. — P. 1055–1063. .

143. Kędziora, A., Speruda, M., Krzyżewska, E., Rybka, J., Tarek, S., & Huras, B. (2018). Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 444. <https://doi.org/10.3390/ijms19020444>

144. Lai Y.S., Zhou Y., Eustance E., Straka L., Wang Z., Rittmann B.E. Cell disruption by cationic surfactants affects bioproduct recovery from *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Algal Res.* 2018. 3:250–255.

145. Landsberg, G.; Mandelstam, L. Über die Lichtzerstreuung in Kristallen. *Zeitschrift für Phys.* 1928, 50, 769–780.

146. Lansdown, A. B. G. (2010). A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2010, Article ID 910686.

<https://doi.org/10.1155/2010/910686>

147. Laube V.M., McKenzie C., Kushner D.J. Strategies of response to copper, cadmium and lead by a blue-green and a green algae. // *Can. J. Microbiol.* 1980. 26:1300–1311.

148. Lazar, D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1412(1), 1–28. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00047-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00047-x)

149. Le Ouay, B., & Stellacci, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today*, 10(3), 339–354. .

150. Legner, R.; Voigt, M.; Servatius, C.; Klein, J.; Hambitzer, A.; Jaeger, M. A Four-Level Maturity Index for Hot Peppers (*Capsicum annum*) Using Non-Invasive Automated Mobile Raman Spectroscopy for On-Site Testing. *Appl. Sci.* 2021, 11, 1614.

151. Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371–384.

152. Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2020). Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresource Technology*, 303, 122886.

153. Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, 68, 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>

154. Li P., Harding S.E., Liu Z. Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications // *Biotechnol. Gen. Eng.* 2002. 18:375–404.

155. Li, J., Zhang, X., Wang, Y., & Li, X. (2020). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Scenedesmus quadricauda* and their effects on nutrient removal. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 12345–12356.

156. Li-Li Dong, Guo-Qing Zhang, Wei Li, et al. (2020) Effects of Cu²⁺ and Hg²⁺ on Growth and Photosynthesis of Two *Scenedesmus* Species. *Pol. J. Environ.*

Stud. 29(2), 1129-1135.

157. Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1–F4.3.8.

158. Lichtenthaler, H. K., Langsdorf, G., Lenk, S., & Buschmann, C. (2005). Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica*, 43, 355–369.

159. Lintner, M., Balzano, S., Keul, N., Heinz, P., Manecki, M., Klimek, A., Wanek, W., Cyran, N., Gruber, D., Schmidt, K., Holzmann, M., Goleń, J., & Tyszk, J. (2025). Biosorption of heavy metals by microalgae: Hazardous side effects for marine organisms. *Chemosphere*, 372, 144080. .

160. Liudmila V. Stelmakh, Irina M. Mansurova, et al. (2022) Toxicity effects of copper on two species of marine diatoms microalgae and two species of dinoflagellates. *Ecologica Montenegrina* 58, 55-68.

161. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527–534. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z>

162. Long, D. A. (2002). *The Raman Effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0470845767>

163. Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666(1–2), 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.002>

164. Luis López-Maury, Francisco J Florencio, José C Reyes. Arsenic Sensing and Resistance System in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. // *Journal of Bacteriology*. 2003. 185(18):5363-71. DOI:10.1128/JB.185.18.5363-5371.2003.

165. Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in

aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

166. López-Maury, L., Sánchez-Riego, A. M., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2009). The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3534–3543.
<https://doi.org/10.1128/JB.01798-08>

167. Lüring, M., & Van Donk, E. (1997). Morphological changes in microalgae induced by infochemicals released in situ from zooplankton grazers. *Limnology and Oceanography*, 42(4), 783–788.

168. M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, et al. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (2007), pp. 19494-19499, 10.1073/pnas.0708425104.

169. Maeng, S. K., You, S. H., Nam, J.-Y., Ryu, H., Timmes, T. C., & Kim, H.-C. (2018). The growth of *Scenedesmus quadricauda* in RO concentrate and the impacts on refractory organic matter, *Escherichia coli*, and trace organic compounds. *Water Research*, 134, 292–300.

170. Mallick, N., & Mohn, F. H. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(1), 64–69. .

171. Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531–1551.

172. Matorin, D. N., Todorenko, D. A., Seifullina, N. K., Zayadan, B. K., & Rubin, A. B. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology*. 2013. 82(6), 809–814.

173. Mengyuan Gu, Gaofang Yin, Tingting Gan, et al. (2022) Construction of characterization parameters of algal photosynthetic inhibition method for detection

of comprehensive toxicity in water. *Ecological Indicators* 136, 108651.

174. Mishra, K.B.; Víték, P.; Barták, M. A correlative approach, combining chlorophyll a fluorescence, reflectance, and Raman spectroscopy, for monitoring hydration induced changes in Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019, 208, 13–23.

175. Mishra, K.B.; Víték, P.; Mishra, A.; Hájek, J.; Barták, M. Chlorophyll a fluorescence and Raman spectroscopy can monitor activation/deactivation of photosynthesis and carotenoids in Antarctic lichens. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020, 239, 118458.

176. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., & Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatase synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.01.007>

177. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

178. Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>

179. Mojzeš, P.; Gao, L.; Ismagulova, T.; Pilátová, J.; Moudříková, Š.; Gorelova, O.; Solovchenko, A.; Nedbal, L.; Salih, A. Guanine, a high-capacity and rapid-turnover nitrogen reserve in microalgal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 32722–32730.

180. Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2011). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 27(3), 572–585. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>

181. Moore, J.W., Ramamoorthy, S., 1984. Heavy Metals in Natural Waters – Applied Monitoring and Impact Assessment. Springer-Verlag, New York, pp. 268.

182. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver

nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>

183. Morones, J.R., et al. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. .

184. Mosa, K. A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., & Dhankher, O. P. (2016). Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in Plant Science*, 7, 303.

185. Moudříková, Š.; Ivanov, I.N.; Vítová, M.; Nedbal, L.; Zachleder, V.; Mojzeš, P.; Bišová, K. Comparing Biochemical and Raman Microscopy Analyses of Starch, Lipids, Polyphosphate, and Guanine Pools during the Cell Cycle of *Desmodesmus quadricauda*. *Cells* 2021, 10, 62.

186. Moudříková, Š.; Mojzeš, P.; Zachleder, V.; Pfaff, C.; Behrendt, D.; Nedbal, L. Raman and fluorescence microscopy sensing energy-transducing and energy-storing structures in microalgae. *Algal Res.* 2016, 16, 224–232.

187. Moudříková, Š.; Mojzeš, P.; Zachleder, V.; Pfaff, C.; Behrendt, D.; Nedbal, L. Raman and fluorescence microscopy sensing energy-transducing and energy-storing structures in microalgae. *Algal Res.* 2016, 16, 224–232.

188. Moudříková, Š.; Sadowsky, A.; Metzger, S.; Nedbal, L.; Mettler-Altmann, T.; Mojzeš, P. Quantification of Polyphosphate in Microalgae by Raman Microscopy and by a Reference Enzymatic Assay. *Anal. Chem.* 2017, 89, 12006–12013.

189. Murata, N., & Los, D. A. (1997). Membrane fluidity and temperature perception in cyanobacteria and plants. *Progress in Lipid Research*, 36(1), 171–194. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.875>

190. Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(6), 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.11.019>

191. Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of*

Experimental Botany, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>

192. Müller, P., Li, X. P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching: A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>

193. Napiórkowska-Krzebietke, A., & Stawecki, K. (2019). Physiological and metabolic responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to nickel toxicity and warming. *3 Biotech*, 9, 1848.

194. Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., & Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959–8964. <https://doi.org/10.1021/es801785m>

195. Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., & Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959–8964. <https://doi.org/10.1021/es801785m>

196. Nelson, N., & Ben-Shem, A. (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 971–982.

197. Nikiforov-Nikishin, D. L., Kochetkov, N. I., Bugaev, O. D., & Ponomarev, A. K. (2021). The influence of the organo-mineral complex on the growth dynamics of the *Scenedesmus quadricauda* culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 689(1), 012039.

198. Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(7), 742–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.05.013>

199. Němečková, K.; Culka, A.; Němec, I.; Edwards, H.G.M.; Mareš, J.; Jehlička, J. Raman spectroscopic search for scytonemin and gloeocapsin in endolithic colonizations in large gypsum crystals. *J. Raman Spectrosc.* 2021, 52, 2633–2647.

200. OECD. (2011). Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria,

Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

201. Olivia Spain, Martin Plöhn, Christine Funk (2021) The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum* 173:526–535.

202. Osterrothová, K.; Culka, A.; Němečková, K.; Kaftan, D.; Nedbalová, L.; Procházková, L.; Jehlička, J. Analyzing carotenoids of snow algae by Raman microspectroscopy and high-performance liquid chromatography. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019, 212, 262–271.

203. Oukarroum, A. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* / A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic // *Ecotox. Environ. Safe.* –2012. – V.78. – P.80–85.

204. Ouyang, H., Kong, X., He, W., Qin, N., He, Q., Wang, Y., Wang, R., & Xu, F. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Chinese Science Bulletin*, 57(25), 3363–3370.

205. Ouzounidou G., Constantinidou H.A. Changes in Growth and Physiology of Tobacco and Cotton Under Ag Exposure and Recovery: Are They of Direct or Indirect Nature? // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1999. 37, 480–487. DOI: 10.1007/s002449900542.

206. Pacia, M.Z.; Turnau, K.; Baranska, M.; Kaczor, A. Interplay between carotenoids, hemoproteins and the “life band” origin studied in live *Rhodotorula mucilaginosa* cells by means of Raman microimaging. *Analyst* 2015, 140, 1809–1813.

207. Pancha, I., Chokshi, K., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 193, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.107>

208. Papageorgiou, G. C., & Govindjee (Eds.). (2004). *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis*. Springer.

209. Park, M.-H., Park, C.-H., Sim, Y. B., & Hwang, S.-J. (2020). Response of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to salt stress considering nutrient enrichment and intracellular proline accumulation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10), 3624.
210. Pazos, M., Medina, I., & Hultin, H. O. (2005). Effect of pH on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation in cod muscle membranes in vitro and in situ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3605–3612. <https://doi.org/10.1021/jf0403890>
211. Pel E. J. & Dann, M. S. (1991). Multiple stress and plant senescence. In *Integrated Response of Plants to Stress* Mooney H. A., Winner W. E. & Pell E. J., eds., Academic Press: San Diego, pp 189-204.
212. Perales-Vela H.V., Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) / H.V. Perales-Vela, S. González-Moreno, C. Montes-Horcasitas, R.O. Cañizares-Villanueva // *Chemosphere*. – 2007. –V.67. – P.2274–2281.
213. Petchey, O. L., McPhearson, P. T., Casey, T. M., & Morin, P. J. (2004). Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature*, 428(6979), 69–72. <https://doi.org/10.1038/nature02345>.
214. Peñuelas, J., & Filella, I. (2001). Responses to a warming world. *Science*, 294(5543), 793–795. <https://doi.org/10.1126/science.1066860>.
215. Pilát, Z.; Bernatová, S.; Ježek, J.; Šerý, M.; Samek, O.; Zemánek, P.; Nedbal, L.; Trtílek, M. Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification. *J. Appl. Phycol.* 2012, 24, 541–546.
216. Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008–1018.
217. Pirutin, S. K., Jia, S., Yusipovich, A. I., Shank, M. A., Parshina, E. Y., & Rubin, A. B. (2023). Vibrational Spectroscopy as a Tool for Bioanalytical and Biomonitoring Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 6947. <https://doi.org/10.3390/ijms24086947>.

218. Pořízka, P.; Prochazková, P.; Prochazka, D.; Sládková, L.; Novotný, J.; Petrílek, M.; Brada, M.; Samek, O.; Pilát, Z.; Zemánek, P.; et al. Algal Biomass Analysis by Laser-Based Analytical Techniques—A Review. *Sensors* 2014, 14, 17725–17752.
219. Prado, E.; Colin, A.; Servant, L.; Lecomte, S. SERS Spectra of Oligonucleotides as Fingerprints to Detect Label-Free RNA in Microfluidic Devices. *J. Phys. Chem. C* 2014, 118, 13965–13971.
220. Preston, B. L. (2002). Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Management*, 29(3), 311–323. <https://doi.org/10.1007/s00267-001-0023-1>
221. Rai L.C., Jensen E., Rachlin W.A. Morphometric and X-ray Energy Dispersive Approach to Monitoring pH-Altered Cadmium Toxicity in *Anabaena flos-aquae*. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1990. 19:479–487.
222. Raven, J. A., & Giordano, M. (2014). Algae. *Current Biology*, 24(13), R590–R595.
223. Riznichenko G. Y., Lebedeva G. V., Pogosyan S. I. et al. Fluorescence induction curves registred from individual microalgae cennobiums in the process of population growth / // *Photosynthesis Research*. — 1996. — Vol. 5. — P. 1–7.
224. Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L. O., & Caldwell, M. (2002). UV-B as an environmental factor in plant life: Stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(5), 243–251. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(96\)10062-8](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(96)10062-8)
225. Ruchi Acharya and Tayyab Saify (2012) Copper toxicity on cell morphometry of *Scenedesmus quadricauda* Chodat. *Indian J. Applied & Pure Bio.* 27(2), 165-171.
226. Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K.M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M. Raman spectroscopy of proteins: A review. *J. Raman Spectrosc.* 2013, 44, 1061–1076.
227. Sablinskas, V. Instrumentation. In *Handbook of Spectroscopy*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2014; pp. 39–70.
228. Sage, R. F., & Kubien, D. S. (2007). The temperature response of C3 and

C4 photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 30(9), 1086–1106.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01682.x>

229. Sage, R. F., & Pearcy, R. W. (2000). The physiological ecology of C4 photosynthesis. In R. C. Leegood, T. D. Sharkey, & S. von Caemmerer (Eds.), *Photosynthesis* (Vol. 9, pp. 497–532). Springer.

230. Sage, R. F., & Zhu, X. G. (2011). Exploiting the engine of C4 photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 62(9), 2989–3000.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err179>

231. Salisbury F.B., Ross C.W. *Plant Physiology*. (Eds.). Wadsworth Publishing Co., Belmont, California. 1992. 4th ed. 682 pp. (ISBN 0-534-15162-0).

232. Samek, O.; Jonáš, A.; Pilát, Z.; Zemánek, P.; Nedbal, L.; Tríska, J.; Kotas, P.; Trtílek, M. Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo. *Sensors* 2010, 10, 8635–8651.

233. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39–85.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>

234. Schindler, D. W. (1998). Whole-ecosystem experiments: Replication versus realism: The need for ecosystem-scale experiments. *Ecosystems*, 1(4), 323–334. .

235. Schirrmeister B.E., de Vos J.M., Antonelli A., Bagheri H.C. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. 110:1791–1796.

236. Schneider, T., Lan, S., Stuart, A., & Teixeira, J. (2017). Earth System Modeling 2.0: A blueprint for models that learn from observations and targeted high-resolution simulations. *arXiv*. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1709.00037>

237. Schopf J.W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. // *Nova Hedwigia*. 1996. 112:13–32.

238. Sharkey, T. D. (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: Importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species,

and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell & Environment*, 28(3), 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01390.x>

239. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.

240. Sharma, S.K.; Nelson, D.R.; Abdrabu, R.; Khraiwesh, B.; Jijakli, K.; Arnoux, M.; O'Connor, M.J.; Bahmani, T.; Cai, H.; Khapli, S.; et al. An integrative Raman microscopy-based workflow for rapid in situ analysis of microalgal lipid bodies. *Biotechnol. Biofuels* 2015, 8, 164.

241. Shrivastava, N., Shrivastava, V., Singh Tomar, R., & Jyoti, A. (2022). Toxic effects of Zinc Oxide Nanoparticles to *Scenedesmus quadricauda* microalgae. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, Special Issue (3), 253–261.

242. Shutova, V.V.; Tyutyayev, E.V.; Churin, A.A.; Ponomarev, V.Y.; Belyakova, G.A.; Maksimov, G.V. IR and Raman spectroscopy in the study of carotenoids of *Cladophora rivularis* algae. *Biophysics* 2016, 61, 601–605.

243. Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. (2000). Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 316–323. [https://doi.org/10.1002/1097-0274\(200009\)38:3<316::AID-AJIM11>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1097-0274(200009)38:3<316::AID-AJIM11>3.0.CO;2-P)

244. Sinetova M.A., Los D.A. Systemic analysis of transcriptomics of *Synechocystis*: common stress genes and their universal triggers. // *Molecular BioSystems*. 2016. 12:3254–3258.

245. Singh, S., Eapen, S., & D'Souza, S. F. (2006). Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62(2), 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.05.017>

246. Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2008). UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(4), 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>

247. Smith, E., & Dent, G. (2005). Modern Raman spectroscopy: A practical approach. John Wiley & Sons.
248. Solovchenko, A.; Khozin-Goldberg, I.; Selyakh, I.; Semenova, L.; Ismagulova, T.; Lukyanov, A.; Mamedov, I.; Vinogradova, E.; Karpova, O.; Konyukhov, I.; et al. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Res.* 2019, 43, 101651.
249. Song, M., & Pei, H. (2018). The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. *Bioresource Technology*, 263, 525–531.
250. Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). // *Bacteriol. Rev.* 1971. 35:171–205.
251. Stirbet, A., & Govindjee. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2), 236–257.
252. Stirbet, A., & Govindjee. (2012). Chlorophyll a fluorescence induction: A personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynthesis Research*, 113(1–3), 15–61. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9754-5>
253. Stirbet, A., Lazár, D., Guo, Y., & Govindjee, G. (2020). Photosynthesis: Basics, history and modelling. *Annals of Botany*, 126(4), 511–537. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz171>
254. Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321–336.
255. Stoyanova, S., Velitchkova, M., & Popova, A. (2007). Effect of silver ions on the photosynthetic oxygen evolution of pea chloroplasts. *Photosynthetica*, 45(4), 527–532.
256. Strasser B. J., Strasser R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test // *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Vol. 5 / Ed. Mathis P. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

— P. 977-

257. Strasser R., Tsimilli-Michael M., Dangre D., Rai M. Biophysical phenomics Reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the Evaluation of the impact of my-corrhization with *Piriformospora indica* / In: Varma A., Oelmüller R. (eds). — Advanced Tech-niques in Soil Microbiology. — Springer, Berlin, 2007. — P. 319–341.

258. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivasta A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, 2004. vol. 19. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; P. 321–362.

259. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In G. C. Papageorgiou & Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (pp. 321–362). Springer.

260. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In G. C. Papageorgiou & Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis* (pp. 321–362). Springer.

261. Strid, Å., Chow, W. S., & Anderson, J. M. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research*, 39, 475–489.

262. Sunda, W. G., & Huntsman, S. A. (1998). Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment*, 219(1), 165–181.

263. Swierczewska, M.; Liu, G.; Lee, S.; Chen, X. High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2641–2655

264. Sánchez-Baracaldo P., Raven J. A., Pisanid D., Knollf A.H. Early photosynthetic eukaryotes inhabited low-salinity habitats. August. 2017. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1620089114.

265. Tevini, M., Iwanzik, W., & Thoma, U. (1991). Some effects of enhanced UV-B radiation on the growth and composition of plants. *Photochemistry and Photobiology*, 53(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/BF00384258>

266. Tingting Gan, Gaofang Yin, Nanjing Zhao, et al. (2023) A Sensitive Response Index Selection for Rapid Assessment of Heavy Metals Toxicity to the Photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* Based on Rapid Chlorophyll Fluorescence Induction Kinetics. *Toxics* 11, 468.
267. Todorenko, D.A.; Hao, J.; Slatinskaya, O.V.; Allakhverdiev, E.S.; Khabatova, V.V.; Ivanov, A.D.; Radenovic, C.N.; Matorin, D.N.; Alwasel, S.; Maksimov, G.V.; et al. Effect of thiamethoxam on photosynthetic pigments and primary photosynthetic reactions in two maize genotypes (*Zea mays*). *Funct. Plant Biol.* 2021, 48, 994–1004.
268. Todorenko, D.A.; Slatinskaya, O.V.; Hao, J.; Seifullina, N.K.; Radenović, Č.; Matorin, D.N.; Maksimov, G.V. Photosynthetic pigments and phytochemical activity of photosynthetic apparatus of maize (*Zea mays* L.) leaves under the effect of thiamethoxam. *Agric. Biol.* 2020, 55, 66–76.
269. Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepiccolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1–15.
270. Trainor, F. R. (1996). Reproduction in *Scenedesmus*. *Algological Studies*, 11(2), 183–201.
271. Trautmann D., Björn V., Wilde A., Al-Babili S., Hess W. R. Microevolution in cyanobacteria: re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *DNA Res.* 2012. 19(6):435-48. doi: 10.1093/dnares/dss024.
272. Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30(6), 967–977. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
273. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
274. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-*

Biological Interactions, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

275. Vlasov, A.V.; Maliar, N.L.; Bazhenov, S.V.; Nikelshparg, E.I.; Brazhe, N.A.; Vlasova, A.D.; Osipov, S.D.; Sudarev, V.V.; Ryzhykau, Y.L.; Bogorodskiy, A.O.; et al. Raman Scattering: From Structural Biology to Medical Applications. *Crystals* 2020, 10, 38.

276. Voloshko L.N., Gavrilova, O.V., Moustakas M.B. Response of Cyanobacteria strains to stress induced by heavy metal ions. // *Nova Hedwigia*. 2001. 123:487–497.

277. von Caemmerer, S., & Furbank, R. T. (2003). The C4 pathway: An efficient CO₂ pump. *Photosynthesis Research*, 77(2–3), 191–207. <https://doi.org/10.1023/A:1025830019591>

278. Wai-Kuan Yong, Kae-Shin Sim, Sze-Wan Poong, et al. (2018) Interactive effects of temperature and copper toxicity on photosynthetic efficiency and metabolic plasticity in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology* 30:3029–3041.

279. Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., & Peakall, D. B. (2005). *Principles of ecotoxicology* (3rd ed.). CRC Press.

280. Wang Q.J., Singh A., Li H., Nedbal L., Sherman L.A., Govindjee W.J. Net light-induced oxygen evolution in photosystem I deletion mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. // *Biochim Biophys Acta*. 2012. 1817(5):792-801. doi: 10.1016/j.bbabbio.2012.01.004.

281. Wang, J., Wang, Y., Wu, Y., Fan, Y., Zhu, C., Fu, X., Chu, Y., Chen, F., Sun, H., & Mou, H. (2021). Application of Microalgal Stress Responses in Industrial Microalgal Production Systems. *Marine Drugs*, 20(1), 30. <https://doi.org/10.3390/md20010030>

282. Wang, S., Wang, X., Miao, J., & Tian, Y. (2019). Physiological and metabolic responses of *Scenedesmus obliquus* to silver nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 364, 360–368.

283. Wei, D.; Chen, S.; Liu, Q. Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2015, 50, 387–406.

284. Wendler J, Holzwarth AR. State transitions in the green alga *Scenedesmus obliquus* probed by time-resolved chlorophyll fluorescence spectroscopy and global data analysis. *Biophys J*. 1987 Nov;52(5):717-28. doi: 10.1016/S0006-3495(87)83266-6. PMID: 19431709; PMCID: PMC1330176.

285. Wong, Y. K., Yung, K. K. L., Tsang, Y. F., & Ho, K. C. (2015). *Scenedesmus quadricauda* for nutrient removal and lipid production in wastewater. *Water Environment Research*, 87(3), 203–209.

286. Xiao-Ping Xu, Xiao-Fan Yang, Xue-Yu Wei, et al. (2021) Studies on Toxicity and Bioaccumulation of Cu²⁺ in Alga *Scenedesmus obliquus* and Its Effect on Life Table Demography of the Rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Pol. J. Environ. Stud.* 30(1), 893-901.

287. Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L., & Wang, X. (2005). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(2), 79–89. <https://doi.org/10.1080/10408410590921727>

288. Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179.

289. Yamori, W., Hikosaka, K., & Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: Temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research*, 119(1–2), 101–117. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9874-6>

290. Yi Yu, Le You, Dianyi Liu, Whitney Hollinshead. Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a Phototrophic Cell Factory. // *Marine Drugs*. 2013. August. 11(8):2894-2916. doi:10.3390/md11082894.

291. Yong, W.-K., Sim, K.-S., Poong, S.-W., Wei, D., Phang, S.-M., & Lim, P.-E. (2019). Physiological and metabolic responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to nickel toxicity and warming. *3 Biotech*, 9(8), 315.

292. Yoon H.S., Hackett J.D., Ciniglia C., Pinto G., Bhattacharya D. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes // *Mol. Biol. Evol.* 2004. 21:809–818.

293. Yu, H., Kim, J., Rhee, C., Shin, J., Shin, S. G., & Lee, C. (2022). Effects of different pH control strategies on microalgae cultivation and nutrient removal from anaerobic digestion effluent. *Microorganisms*, 10(2), 357. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020357>
294. Zandalinas, S. I., Peláez-Vico, M. Á., Sinha, R., Pascual, L. S., & Mittler, R. (2024). The impact of multifactorial stress combination on plants, crops, and ecosystems: How should we prepare for what comes next? *The Plant Journal*, 117(6), 1800–1814. <https://doi.org/10.1111/tpj.16557>
295. Zeng, J., Ping, W., Sanaeifar, A., Zhang, Y., & Xie, C. (2021). Quantitative visualization of photosynthetic pigments in tea leaves based on Raman spectroscopy and calibration model transfer. *Plant Methods*, 17(1), 4. .
296. Zhang, Z., Wang, Y., Chen, X., & Li, Y. (2023). Silver nanoparticles toxicity to *Scenedesmus quadricauda*: Growth inhibition and oxidative stress. *Environmental Science: Nano*, 10, 456–467.
297. Zhou, K., Hu, Y., Zhang, L., Yang, K., & Lin, D. (2016). The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae. *Scientific Reports*, 6, 32998.
298. Zivcak, M., Brestic, M., Kalaji, H. M., & Govindjee. (2014). Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: Is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with energy dissipation? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 152, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.001>
299. Zümriye Aksu. Chapter: Biosorption of Heavy Metals by Microalgae in Batch and Continuous Systems. In book: *Wastewater Treatment with Algae*. Editors: Yuk-Shan Wong, Nora F. Y. Tam. 1998. P.37-53.