

«Изучение токсичности тяжелых металлов (на примере медного купороса) с использованием флуоресценции микроводорослей»

Маторин Д.Н.

Введение

Большинство веществ, входящих в состав промышленных и бытовых стоков, способны оказывать токсическое действие на микроводоросли. В связи с этим водорослевые биотесты входят в число основных при нормировании качества вод: «Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов», Минприроды РФ, 2002.

В современной практике широко используются стандартизированные методы биотестирования на пресноводных зеленых микроводорослях рода *Scenedesmus* и *Chlorella*, культивируемых по общепринятой методике. Основными показателями токсического действия служат рост и выживаемость культуры. Между тем оценка токсичности вод и в особенности питьевой воды по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции является чрезвычайно актуальна. Флуориметры позволяют регистрировать параметры флуоресценции хлорофилла культур водорослей и быстро обнаруживать в водной среде появление токсических веществ. Преимущества использования флуоресценции связаны с быстротой, низкой трудоемкостью процесса измерения, а также с ее высокой чувствительностью к действию токсикантов, поскольку она отражает состояние фотосинтетического аппарата водорослей, являющегося мишенью для многих веществ. Регистрация на свету первичных изменений фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительного к повреждающим воздействиям, позволяет сократить время инкубации до 1-3 часов, по сравнению с 1-10 сутками при оценке токсичности по снижению скорости роста. Испытания метода на ряде модельных токсикантов (ионы Cu, Hg, Cd, Cr, Zn, гербициды и др.) показали, что чувствительность его находится на уровне ПДК для этих веществ. Методика выполнения измерений обеспечивает выполнение измерений с низкой погрешностью. Учитывая кратковременность экспериментов и предусмотренную методикой возможность жесткого контроля за условиями проведения опытов, разброс измеряемых параметров в повторах относительно низкий.

В настоящее время флуоресцентные методы включены в методы биотестирования «Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей.» ФР.1.39.2007.03223. / Н.С.Жмур, Т.Л. Орлова // М., «Акварос»2007. и биомониторинга для контроля качества природных вод «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом»// Маторин Д.Н.,

Осипов В.А., Рубин А. Б. и др. ФР.1.39.2011.11246, ПНДФ14.2.268-2012.М., Альтрекс. 2012. 35 с.

Применение флуоресценции водорослей в качестве биосенсоров, по-видимому, может быть с успехом использовано для тестирования тяжелых металлов. Соли тяжелых металлов занимают особое положение среди загрязнений внешней среды, что связано с их высокой токсичностью, способностью накапливаться в организмах и передаваться по трофической цепи. Действие металлов различно и зависит от природы металла, типа соединения, в котором он существует в природной среде, а также его концентрации. К возможным источникам загрязнения биосферы тяжелыми металлами относят предприятия черной и цветной металлургии (аэрозольные выбросы, загрязняющие атмосферу, промышленные стоки, загрязняющие поверхностные воды), заводы машиностроения (гальваника, никелирование, хромирование), заводы по переработке аккумуляторных батарей, автомобильный транспорт.

Тяжелые металлы, попадая в живой организм, часто приводят к его отравлению или гибели. По токсичности можно выделить приоритетную группу- кадмий, медь, мышьяк, никель, ртуть, свинец, цинк и хром как наиболее опасные для здоровья человека и животных. Тяжелые металлы, попадая в водоемы, оказывают токсическое действие на фитопланктон, который является первичным звеном в системе пищевых связей водных организмов и определяет состояние водной экосистемы в целом. Среди метаболических процессов внутри растительной клетки наиболее чувствительным к действию тяжелых металлов является фотосинтез. Исследования показывают, что по флуоресценции водорослей возможно обнаруживать разные токсичные загрязнители и, особенно, соли тяжелых металлов, при достаточно низких концентрациях.

Цель данной задачи – освоение методов флуоресцентного анализа на примере исследования токсического действия солей тяжелых металлов (соли меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) на микроводоросли с использованием современных методов регистрации параметров световых кривых флуоресценции хлорофилла.

Теоретическое введение

Природа флуоресценции хлорофилла *a* в фотосинтетических мембранах растений и водорослей.

Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей. Энергия кванта света, поглощенного светособирающим комплексом, может быть превращена в энергию разделенных зарядов, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или рассеяно в тепло.

Существует два наиболее вероятных для молекулы хлорофилла синглетных возбужденных уровня: более высокий (S_2^*) на который переходит электрон при поглощении кванта синего и более низкий (S_1^*) на который переходит электрон при поглощении кванта красного света (Рис.1). Это определяет наличие в спектре поглощения хлорофилла двух главных пиков, синего и красного максимума. При этом поглощение кванта синего света электрон попав на более высокий энергетический уровень, тотчас же падает обратно на «красную» орбиту.

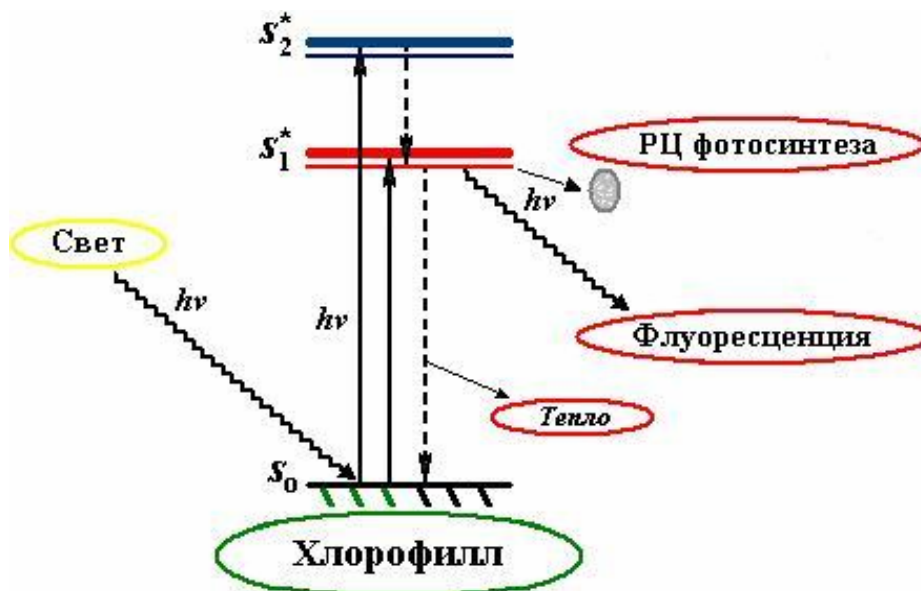


Рис. 1. Электронные переходы молекулы хлорофилла при поглощении квантов света. Прерывистые стрелки - безызлучательные переходы. Красная и синяя горизонтальные линии соответствуют поглощению квантов света в красной и синей области спектра.

Одним из путей дезактивации возбуждения (перехода молекулы из состояния S_1^* в основное состояние) наряду с тепловой диссипацией и использованием при фотосинтезе является испускание квантов красного света, называемое флуоресценцией. Флуоресценция испускается при переходе молекулы из возбужденного синглетного состояния в основное. Время жизни флуоресценции для большинства органических молекул, в том числе и для хлорофилла, лежит в пределах от 10^{-9} до 10^{-6} с.

Реакционный центр ФС2 состоит из специальной молекулы хлорофилла P_{680} , которая в возбужденном состоянии является первичным донором электрона для хинонного акцептора Q_A . Восстановление P_{680}^+ происходит очень быстро, менее чем за 1 мкс, а скорость окисления Q_A^- значительно меньше и лимитируется темновыми реакциями. Состояние реакционного центра ФС2 в котором P_{680} восстановлен и Q_A окислен, называется открытым. Через время порядка 1 мкс после разделения зарядов и появления первичной пары $P_{680}^+ Q_A^-$ происходит восстановление P_{680}^+ от вторичных доноров. В результате РЦ оказывается в состоянии $P_{680} Q_A^-$, которое называется закрытым (Рис.2). Энергия кванта света, поглощенного в ФС2, может быть

превращена в энергию разделенных зарядов $P_{680}^+Q_A^-$, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или рассеяния в тепло. Эти три процесса характеризуются константами скорости K_p , K_f и K_d , соответственно (Рис.2).

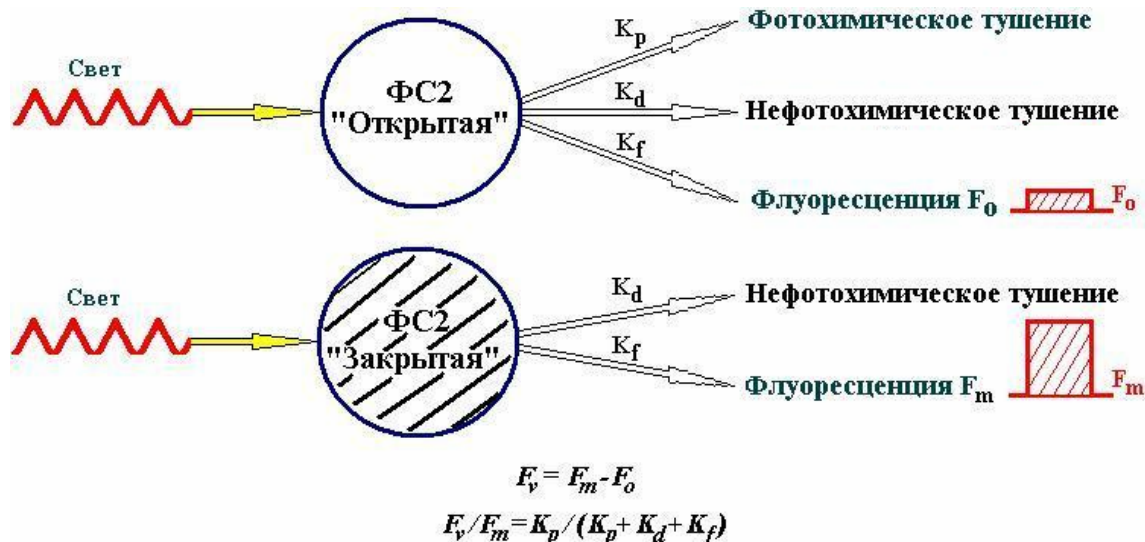


Рис. 2.Схема изменения эффективности использования световой энергии при открытых и закрытых реакционных центрах фотосистемы 2. При открытых РЦ ФС2 энергия поглощенных квантов света используется в фотосинтезе (K_p), рассеивается в тепло (K_d) и испускается в виде флуоресценции (K_f), выход флуоресценции низкий (F_0). При закрытых РЦ ФС2 энергия не используется в фотосинтезе ($K_p=0$), а расходуется в нефотохимическое тушение (K_d) и во флуоресценцию (K_f), выход флуоресценции максимальный (F_m).

При открытом состоянии реакционных центров эффективность использования энергии возбуждения в фотосинтезе высока, вероятность потери энергии минимальна и квантовый выход флуоресценции, ($F_0 = K_f / (K_p + K_f + K_d)$), минимален и составляет около 2%. Уровень постоянной флуоресценции F_0 с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию пигментов фотосинтетического аппарата фитопланктона, осуществляющих светосбор энергии и, соответственно, также коррелирует с обилием клеток водорослей. Поэтому он может быть использован для оценки ростовых процессов культур клеток. Снижение выхода флуоресценции хлорофилла в результате использования энергии света в первичных реакциях фотосинтеза называют фотохимическим тушением флуоресценции хлорофилла.

При закрытых реакционных центрах фотохимическое разделение зарядов становится невозможным, и квантовый выход флуоресценции возрастает до $F_m = K_f / (K_f + K_d)$ и составляет около 5%. Разность между максимальным и минимальным выходом флуоресценции $F_v = F_m -$

F_0 называется переменной флуоресценцией. Эта величина пропорциональна той части энергии света, которая не используется в фотохимических реакциях фотосинтеза и теряется в виде флуоресценции и тепла при закрытых реакционных центрах. Из приведенных выше соотношений связи значений выхода флуоресценции при открытых и закрытых реакционных центрах следует одно из важнейших соотношений $F_v/F_m = K_p/(K_p + K_f + K_d)$, т.е. отношение интенсивностей переменной и максимальной флуоресценции (относительный выход переменной флуоресценции) равно квантовому выходу использования энергии света открытыми реакционными центрами ФС2. По изменению этой величины можно судить об эффективности основного фотосинтетического запасаания энергии электронного возбуждения P_{680} в различных условиях. У водорослей в оптимальных условиях F_v/F_m близко к 0.7, а при действии токсикантов - уменьшается. У мертвых водорослей $F_v/F_m=0$. В настоящее время этот параметр флуоресценции как показатель состояния и эффективности функционирования фотосинтетического аппарата широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Важным преимуществом флуоресцентных методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние клеток микроводорослей под действием токсикантов непосредственно в среде их обитания *in situ* в режиме реального времени. Оперативность измерений параметров флуоресценции имеет особое значение для раннего обнаружения появления поллютантов в среде.

На кафедре биофизики биологического факультета МГУ разрабатываются методы и аппаратура для регистрации параметров быстрой флуоресценции флуоресценции хлорофилла на культурах микроводорослей и природном фитопланктоне непосредственно в среде его обитания *in situ*. В частности, создан погружной зонд-флуориметр, позволяющий оценивать состояние фитопланктона в водоеме по глубине и по акватории и тем самым выявлять места антропогенных воздействий.

В данной задаче предлагается провести сравнительное исследование световых зависимостей параметров флуоресценции при действии различных концентраций солей тяжелых металлов у зеленых пресноводных водорослей.

Организация задачи практикума

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством одного преподавателя и выполняет отдельное исследование, которое может производиться как независимо, так и в рамках цикла задач. Местом проведения являются лаборатории кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

В ходе выполнения работы используется следующее оборудование:

- 1) Импульсно-модулированный флуориметр Water-PAM фирмы Walz, Effeltrich, Germany.
- 2) Шейкер S-3.08-M платформа 347 x 235 мм, до 300 об/мин, движение орбитальное, электронный.
- 3) Центрифуга CM 6M производства фирмы Elmi.
- 4) Пробирки пластиковые 5 штук на 15 мл.
- 5) Дозаторы пипеточные - на 1 мл, 200 мкл, 10 мкл;
- 6) Климатическая камера для выращивания и инкубирования водорослей с исследуемым препаратом (автоматическое поддержание температуры и светового режима).

Описание задачи

Материалы и методы.

Материалом для исследований служит альгологически чистые культуры одноклеточных пресноводных водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb (рис.3), или *Chlorella pyrenoidosa* (мы ни разу не использовали хлореллу), выращенные на среде Успенского-1 в соответствии с методикой. Состав среды (г/л): KNO_3 – 0.250, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.025, K_2CO_3 – 0.345, $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.144; растворы микроэлементов - 1 см³ из смеси H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1.81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.222 г/л; MoO_3 – 17.64; NH_4VO_3 – 22.96 мг/л. До начала экспериментов водоросли культивируются при температуре $24^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ и периодическом освещении (12 часов свет 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{c}$: 12 часов темнота).

После добавления токсиканта водоросли экспонируют от 1 час при разных концентрациях исследуемых металлов в тех условиях, что и при выращивании культуры с орбитальным перемешиванием с использованием шейкера.

Препарат.

В опытах используются различные соли тяжелых металлов, в частности препарат медного купороса $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$. Сульфат меди (CuSO_4) в безводном состоянии представляет собой белый порошок, который при поглощении воды синееет. Водный раствор сульфата меди имеет характерный сине-голубой цвет. Эта окраска свойственна гидратированным ионам $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. Возможно проведение опытов на ряде других модельных токсикантов (ионы Hg, Cd, Cr, Zn,).

Флуориметр Water-PAM.

В работе используется импульсный флуориметр WaterPAM (Walz, Германия) (рис.3). Water-PAM служит для измерения различных параметров флуоресценции и их световых зависимостей. Процедура измерения фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции на флуориметре приведена на рисунке 4. Сначала измеряется уровень F_0 у выдержанного в темноте образца при открытых реакционных центрах. Затем подается один

импульс насыщающего света 0,8 с, который закрывает реакционные центры и убирает фотохимическое тушение. При этом режиме регистрируют максимальную флуоресценцию F_m . Эти два уровня задают максимальную величину переменной флуоресценции $F_v = F_m - F_0$. Через некоторый интервал времени включается постоянный действующий свет, который индуцирует изменения выхода флуоресценции, характерные для обычной индукционной кривой флуоресценции хлорофилла $F_{(t)}$. При этом на всем протяжении индукционной кривой переменная величина $F_{(t)}$ остается меньше, чем F_m . Разница между F_m и $F_{(t)}$ характеризует общее тушение флуоресценции, которое развивается под действием постоянного света. Общее тушение складывается из фотохимического и нефотохимического тушения. Во время действия насыщающей вспышки фотохимическое тушение снимается, и флуоресценция возрастает до значения F_m' . Однако, значение F_m' остается меньше, чем F_m . Так как в обоих случаях фотохимическое тушение отсутствует, разница между $(F_m - F_m')$ характеризует величину нефотохимического тушения, индуцированного постоянным освещением. Соответственно, разница $(F_m' - F_{(t)})$ характеризует величину фотохимического тушения и пропорциональна количеству фотосинтетически активных центров ФС2 на этом свете.

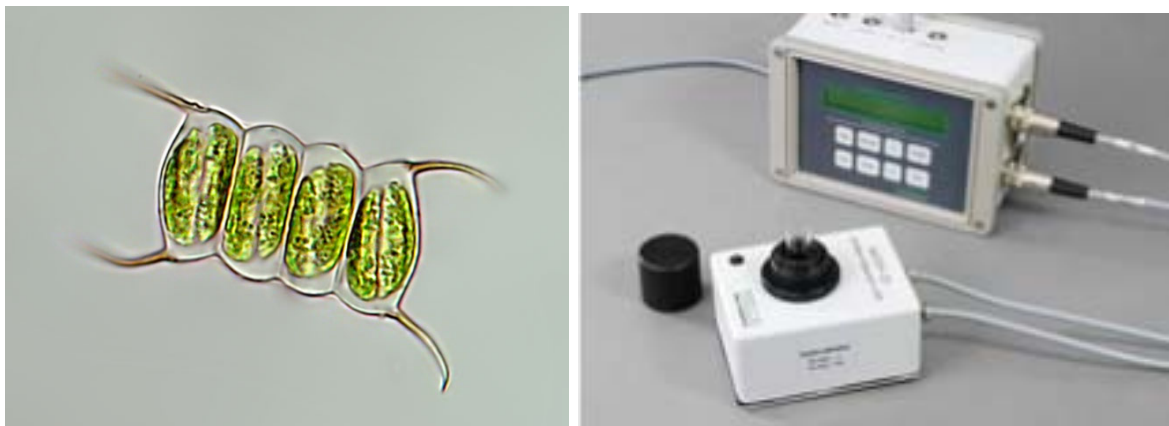
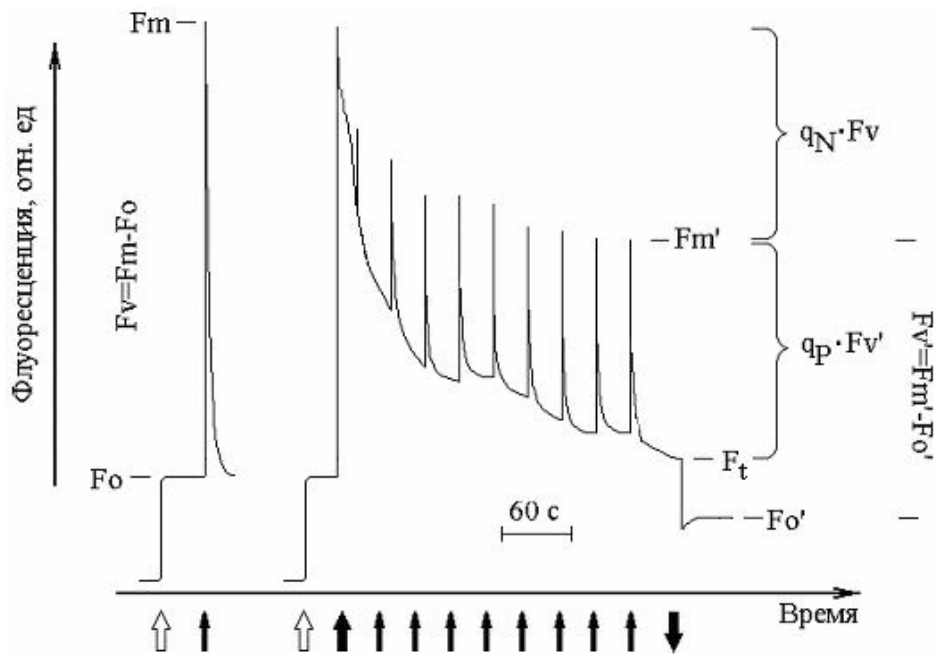


Рис. 3. Слева - фото ценобий (колонии) из 4 продолговатых клеток зелёных водорослей из класса протококковых *Scenedesmus quadricauda*. Справа - внешний вид импульсного флуориметра Water-PAM.



- 1) Фотохимическое тушение $qP = (F_m - F_t) / (F_m - F_o')$
- 2) Нефотохимическое тушение $qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_o')$
- 3) Квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в фотосистеме 2 (ФС2) как отношение $Yield = (F_m' - F_t) / F_m' = F_v / F_m'$

Рис. 4. Принцип регистрации разных параметров флуоресценции, в том числе величин фотохимического (qP) и нефотохимического тушений (qN , NPQ) при постоянном освещении на флуориметре. F_0 и F_m – постоянная и максимальная флуоресценция у адаптированного к темноте листа при одиночном освещении односекундным импульсом мощного белого света; F_0' и F_m' – постоянная и максимальная флуоресценция после продолжительного освещения; F_t – квазистационарный уровень флуоресценции у адаптированного к свету листа; Светлые стрелки–включение и выключение измеряющего модулированного света, жирные темные стрелки – соответственно начало и конец непрерывного освещения, тонкие темные соответствует коротким вспышкам света насыщающей интенсивности.

На свету проводятся измерения быстрых световых зависимостей различных параметров флуоресценции при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 900 $\mu E / (m^2 \cdot c)$. Протокол измерения световых кривых показан на рисунке 5.

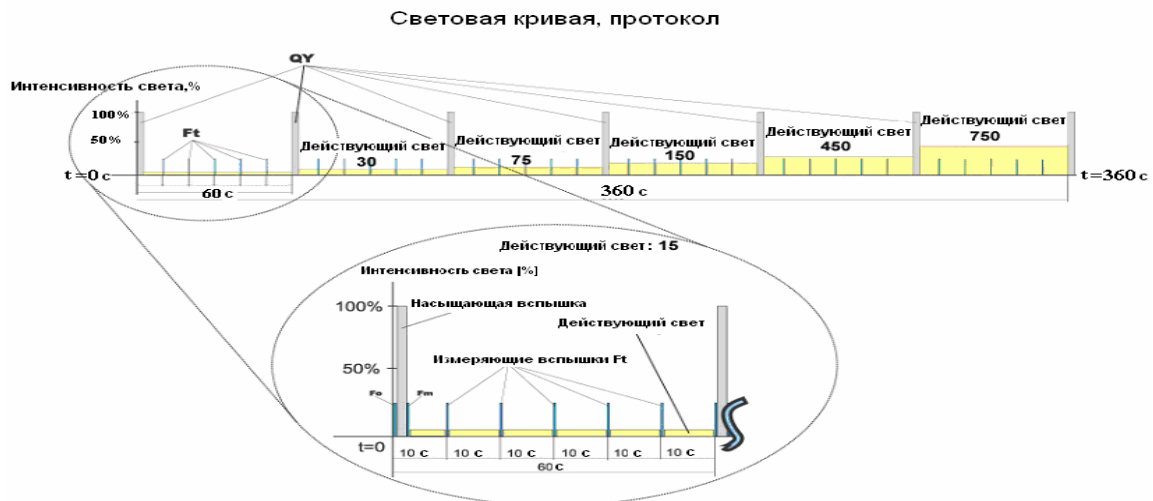


Рис. 5. Принцип регистрации световой кривой флуоресценции на импульсном РАМ флуориметре. Интенсивность действующего света приведена в $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$.

Время освещения при каждой интенсивности составляет 30 секунд. При таких временах освещения быстрые переходные процессы, связанные с изменением интенсивности, заканчиваются и световые зависимости близки к таковым, регистрируемым при длительном стационарном освещении. В конце каждого сеанса освещения измеряется выход флуоресценции хлорофилла F_t , а также параметры F_m' с использованием насыщающей вспышки (0.8 с, $2000 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$). На основании всех параметров определяется квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС 2 как отношение $Y = (F_m' - F_t)/F_m'$, нефотохимическое тушение флуоресценции $NPQ = (F_m - F_m')/F_m$ и относительная скорость нециклического электронного транспорта при данной интенсивности света ($gETR$). Скорость транспорта электронов рассчитывается по формуле $gETR = Y \cdot E_i$, где E_i – освещенность, $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. На основании полученных световых кривых оценивают следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световых кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи ($gETR_{\text{max}}$) и насыщающую интенсивность света (E_n). α рассчитывают как коэффициент линейной регрессии, построенной по точкам, лежащим на светолимитированном участке световых кривой, $gETR_{\text{max}}$ – как среднее по значениям $gETR$, находящимся на светонасыщающем участке. E_n рассчитывают по формуле $E_n = gETR_{\text{max}} / \alpha$. Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой.

План работы:

1) Установить рабочую концентрацию водорослей в суспензии по сигналу F_t для работы в оптимальном диапазоне чувствительности прибора. При необходимости разбавить образцы непосредственно в измерительной кювете. Определить отношения F_v/F_m для

контрольного образца для подтверждения высокой фотосинтетической активности водорослей.

2) Разлить суспензию водорослей в 5 пробирок по 15 мл. Одну пробирку оставить в качестве контрольного образца. В оставшиеся пробирки добавить такое количество раствора сульфата меди, чтобы конечная концентрация токсиканта в суспензиях равнялась 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} M, соответственно.

3) Провести инкубацию водорослей с CuSO_4 в камере для культивирования в течение одного часа.

4) Провести измерение параметров флуоресценции хлорофилла *a* у инкубированных образцов на приборе Water-PAM. Построить графики по световым зависимостям параметров флуоресценции (Yield, NPQ, rETR) и рассчитать параметры световой кривой относительной скорости нециклического электронного транспорта (коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи (rETR_{max}) и насыщающую интенсивность света (E_n).

5) Применить программные пакеты для обработки полученных результатов.

6) Сделать выводы по проделанной работе и написать отчет.

Предполагаемые результаты

1. Освоение методики приготовления различных концентраций соли тяжелых металлов ;

2. Освоение методов регистрации параметров флуоресценции микроводорослей на предложенных приборах;

3. Анализ быстрых световых кривых флуоресценции, и выявление наиболее информативных показателей;

4. Приобретение навыков проведения экспериментов по биотестированию для характеристики токсичности медного купороса;

5. Результаты, полученные по параметрам флуоресценции продемонстрируют изменения метаболических процессов внутри растительной клетки при действии солей меди- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Задача может ознакомить биофизиков, биологов, химиков, гидробиологов и экологов с подходами по оценке токсического действия солей тяжелых металлов на микроводоросли.

Оценка итогов проведенного практикума

Основной формой отчетности студентов является отчет в электронном и письменном виде по результатам исследования, который должен включать:

1. Краткое теоретическое введение с описанием исследуемого объекта и указанием преимуществ быстрых флуоресцентных параметров для исследования объекта;
2. Четко сформулированные цели и задачи исследования;
3. Описание основных методов исследования;
4. Корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и обсуждение полученных результатов;
5. Четкие выводы по полученным результатам;
6. Список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами устную беседу, в ходе которой студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

Описание порядка выполнения измерений

Порядок измерения световых кривых с помощью прибора WaterPAM.

Для проведения измерений необходимо последовательно выполнить следующие действия:

- 1) Запустить программу wincont.exe. На экране компьютера появляется интерфейс программы.
- 2) При усилении Gain-2 в вкладке Light Curve измерить световую зависимость. Для этого в правом верхнем окне Online Parameter дождаться пока сигнал фоновой флуоресценции F_t перестанет сильно меняться и остановится на одном уровне сигнала.
- 3) Начать измерение световых зависимостей Yield, NPQ, rETR нажатием на «Start» в интерфейсе программы. Повторность измерений должна быть трехкратной, для дальнейшего усреднения полученных результатов (если во время измерений обнаружится выпадение точек, то следует переизмерить новый образец).
- 4) После завершения измерений сохраните файл в расширении csv, затем экспортировать его в Excel.
- 5) Перенести данные на съемный носитель и закрыть программу.

Оформление результатов и их обсуждение

1. Для опытных образцов с изменениями в значении F_v/F_m в 20-30 % построить графики световых зависимостей параметров флуоресценции Yield, NPQ, rETR и сравнить с параметрами контрольного образца (см. для примера рис.6. с сульфатом меди).

2. На основании полученных световых кривых гЕТР рассчитать следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световых кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи ($rETR_{max}$) и насыщающую интенсивность света (E_n). Данные представить в таблице и сравнить с контрольным образцом (см. для примера таблицу с медью).

3. Если для каждой пробы делалось несколько измерений, то определить перечисленные соотношения для каждого из зарегистрированных кривых, а в итоговую таблицу внести средние значения и стандартное отклонение или ошибку среднего.

4. Представить в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и провести обсуждение их и сделать четкие выводы по полученным результатам; Отметить параметры флуоресценции, которые наиболее сильно изменяются при повреждении культуры в присутствии загрязнителя.

Ниже для примера приведены результаты, полученные в опытах по исследованию действию ионов меди на параметры флуоресценции водорослей.

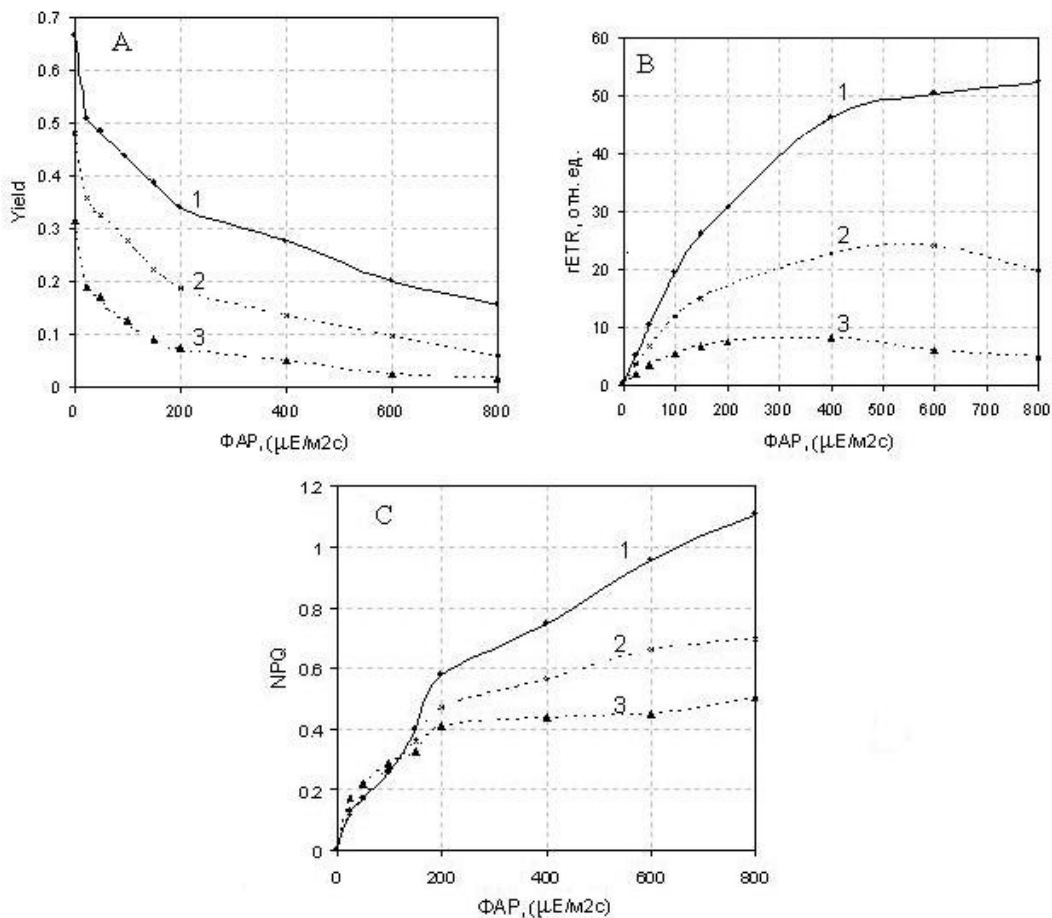


Рис. 6. Изменения параметров флуоресценции в зависимости от интенсивности действующего света в суспензии клеток водорослей *Scenedesmus quadricauda* под

воздействием CuSO_4 . Время инкубации 1 сутки. A – квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в фотосистеме 2 как отношение $Y = (F_m' - F_t)/F_m'$, B – относительная скорость нециклического электронного транспорта, C – нефотохимическое тушение $NPQ = (F_m/F_m') - 1$. (1) – контроль, (2), (3) – после добавления CuSO_4 в концентрациях $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ и $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, соответственно.

Таблица. Изменения параметров световых зависимостей флуоресценции клеток *C. reinhardtii* в контроле и после CuSO_4 (суточная инкубации)

Параметры световых кривых	Контроль	10^{-5}M	10^{-4}M	10^{-3}M
F_v/F_m	0.66	0.67	0.48	0.31
NPQ $25 \mu\text{E}/\text{M}^2\text{c}$	0.13	0.13	0.12	0.17
NPQ $400 \mu\text{E}/\text{M}^2\text{c}$	0.74	0.63	0.56	0.44
$rETR_{\text{max}}$	52.4	49.8	24.1	8.2
α , угол наклона	0.21	0.21	0.14	0.07
$E_{\text{нас}}$, $rETR$ $\mu\text{E}/\text{M}^2\text{c}$	249	237	172	117

где, F_v/F_m – параметры проб в темноте; $Y = (F_m' - F_t)/F_m'$ – фотохимическая активность ФС 2 на свету; NPQ – нефотохимическое тушение; Параметры, описывающие зависимость электронного транспорта ($rETR$) от освещенности (световые кривые): коэффициент максимальной утилизации световой энергии, угол наклона световой кривой (α), максимальная относительная скорость нециклического транспорта электронов ($rETR_{\text{max}}$) и насыщающая интенсивность света (E_n).

Дополнительные вопросы

- Природа быстрой флуоресценции хлорофилла у водорослей?
- Методика регистрации фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции и расчет относительной скорости нециклического транспорта электронов при фотосинтезе?
 - Связь параметров световой кривой флуоресценции с конкретными реакциями фотосинтеза?
 - Какую информацию можно получить о действии тяжелых металлов на водоросли при использовании методов регистрации световых кривых флуоресценции?
 - Какие еще методы можно использовать для контроля качества водной среды при действии тяжелых металлов?

ЛИТЕРАТУРА

Маторин Д. Н., Рубин А. Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. М.: – Ижевск: ИКИ-РХД, 2012. 256 с.

Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты // Учебно-методическое пособие. М.: Альтрекс. 2012. 131 с.

Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов // Министерство природных ресурсов РФ РЭФИА. НИА. М.: Природа. 2002. 117с.

Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. ФР.1.39.2007.03223. / Н.С. Жмур, Т.Л. Орлова // Москва, Акварос. 2007. 48 с.

Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом // Маторин Д. Н., Осипов В. А., Рубин А. Б. и др. ФР.1.39.2011.11246, ПНДФ14.2.268-2012.М.:, Альтрекс. 2012. 35 с.

Филенко О.Ф. Водная токсикология // М.: Изд. Черноголовка. 1988. 156 с.

Schreiber U. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis / U. Schreiber [et all.] // In: Schulze ED. Caldwell MM (eds) Ecophysiology of photosynthesis. Springer. Berlin. 1994 .P. 49-70.

Vavilin D.V, Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S. The sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // J. Plant Physiol. 1995. V. 146 (5-6). P. 609-613.