

## ИЗУЧЕНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ *Chlamydomonas reinhardtii* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРИМЕТРА M-PEA-2

© 2016 г. Д.Н. Маторин\*, Ф.Ф. Протопопов\* \*\*, А.К. Садвакасова\*\*\*,  
А.А. Алексеев\*\*, Л.Б. Братковская\*, Б.К. Заядан\*\*\*

\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: matorin@biophys.msu.ru

\*\*Физико-технический институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова,  
677000, Якутск, ул. Кулаковского, 48

E-mail: protopopov\_fedor@mail.ru

\*\*\*Казахский национальный университет имени аль-Фараби,  
050040, Алматы, пр. аль-Фараби, 71, Республика Казахстан

E-mail: sadvakasova1979@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.16 г.

Получены пигментные светозеленые мутанты микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard с пониженным содержанием хлорофилла *b*. Одновременная регистрация в микросекундном интервале индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния P700 на приборе M-PEA-2 выявила уменьшение квантового выхода электронного транспорта в фотосистеме II ( $\Phi_{E_0}$ ) и индекса производительности ( $PI_{ABS}$ ), а также увеличение квантовой эффективности рассеивания энергии ( $\Phi_{D_0}$ ) и  $\Delta pH$ -зависимого нефотохимического тушения ( $q_E$  и  $NPQ$ ). Световые зависимости параметров флуоресценции подтвердили снижение коэффициента максимальной утилизации световой энергии ( $\alpha$ ) у мутантов. Однако при средних освещенностях в стационарных условиях мутанты показали достаточную скорость электронного транспорта. Обнаружено отсутствие прямого действия мутаций на реакции окисления пигмента фотосистемы I – P700 и уменьшение замедленной флуоресценции. Использование полученных мутантов на загрязненных водах на объектах Казахстана подтвердило перспективность применения их в биомониторинговых исследованиях на наличие мутагенов.

*Ключевые слова:* быстрая и замедленная флуоресценция хлорофилла *a*, биомониторинг, *Chlamydomonas reinhardtii*, JIP-тест, M-PEA-2.

Микроводоросли являются одними из основных объектов, используемых в биотестировании для оценки токсичности водной среды [1]. В последнее время флуоресцентные методы внедрены в методики биотестирования для слежения за состоянием водорослей [2,3]. Флуоресцентные методы могут быть использованы на природных популяциях водорослей при биомониторинге [1]. На кафедре биофизики МГУ имени М.В. Ломоносова разработана методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах

флуоресцентным методом, которая допущена для целей государственного экологического контроля по разделу «Количественный химический анализ вод» [4].

Флуоресцентные методы оценки активности фотосинтетического аппарата могут дать подробную информацию о начальных нарушениях клеточного метаболизма в основном на мембранном уровне [5,6]. Такие методы позволяют получать информацию о состоянии микроводорослей в режиме реального времени. Хлорофилл, находящийся в мембранах водорослей, служит своего рода природным индикатором фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов флуоресценции.

Сокращения: ФС I – фотосистема I; ФС II – фотосистема II; ЗФ – замедленная флуоресценция, ETR – относительная скорость нециклического электронного транспорта.

Удобными объектами для выявления действия различных загрязнений (в том числе и мутагенных) на популяции водорослей является зеленая одноклеточная водоросль хламидомонада (*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard) – модельный объект в генетике [1]. Она может быть использована для определения не только токсичности загрязненной воды, но и ее мутагенной активности.

В настоящей работе методами индуцированного мутагенеза получены мутантные штаммы *Chl. reinhardtii*, с использованием спектральных методов и флуориметра М-РЕА-2 (Hansa-Tech, Великобритания) проведены исследования активности фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II). Показана перспективность использования пигментных мутантов при биотестировании водных экосистем на наличие мутагенов путем регистрации возникновения ревертантов зеленого цвета.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения мутантов микроводоросли *Chl. reinhardtii* применяли ультрафиолетовое излучение длиной волны 254 нм (40 эрг/мм<sup>2</sup>). Облученную суспензию переносили на чашки Петри со средой L2-min. Посевы выставляли на свет (120 мкЕ/м<sup>2</sup>·с) и через 10–14 сут учитывали результаты. Из колоний по форме и размеру было отобрано для проведения дальнейшего исследования 12 мутантных субклонов, которые подвергали дальнейшей селекции – до десяти последовательных циклов. Из 12 колоний методом многократной селекции были отобраны 3 колонии, сохранившие приобретенные в результате индуцированного мутагенеза признаки. В генетических экспериментах для исследования материала использовали метод макроколоний и метод микроколоний [7].

Измерения флуоресцентных показателей водорослей проводили на импульсном флуориметре WaterPAM (Walz, Effelrich, Германия). В адаптированных к темноте образцах регистрировали постоянную ( $F_0$ ) и максимальную флуоресценцию ( $F_M$ ), а также максимальный выход переменной флуоресценции  $F_V/F_M = F_M - F_0/F_M$ , который является мерой потенциальной квантовой эффективности ФС II. Измерения световых зависимостей различных параметров флуоресценции на свету выполнялись при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 800 мкЕ/м<sup>2</sup>·с [8]. Время освещения составляло 50 с. В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности с использованием насыщающей вспышки (0,8 с, 3000 мкЕ/м<sup>2</sup>·с) регистрировали параметры  $F'_M$ ,

а также выход флуоресценции на свету  $F(t)$ . На основании всех параметров рассчитывали нефотохимическое тушение флуоресценции  $NPQ = (F_M - F'_M)/F'_M$ , квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС II как отношение  $Y = (F'_M - F_t)/F'_M$  и относительную скорость нециклического электронного транспорта при данной интенсивности света ( $ETR$ ). Скорость транспорта электронов рассчитывали по формуле  $ETR = Y \cdot E_i \cdot 0,5$ , где  $E_i$  – освещенность. На основании полученных световых кривых  $ETR$  оценивали следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона кривой,  $\alpha$ ) и максимальную относительную скорость электронов по электрон-транспортной цепи ( $ETR_{max}$ ).  $\alpha$  рассчитывали как коэффициент линейной регрессии, построенной по точкам, лежащим на светолимитированном участке кривой  $P/E$ . Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой [8].

Индукционные кривые быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла, а также окислительно-восстановительные превращения P700 измеряли одновременно с помощью прибора Multi function Plant Efficiency Analyser (M-PEA-2, Hansatech Instruments, Великобритания) [5,6,9]. Регистрацию быстрой и замедленной флуоресценции производили при чередовании действующего красного света (интенсивность 1300 мкЕ/м<sup>2</sup>·с, максимум в спектре излучения 625 нм) и темновых интервалов малой длительности, достаточных для регистрации замедленной флуоресценции (ЗФ). Индукционную кинетику флуоресценции измеряли с максимальным временным разрешением 0,01 мс. Считается что изменение поглощения при длине волны 820 нм отражает редокс-состояние P700, реакционного центра ФС I [6,10]. Интенсивность модулирующего света с пиком при длине волны 820 ± 25 нм выбрали равной 1000 мкЕ/м<sup>2</sup>·с. Полученные данные отражения нормировались относительно значения отражения при  $t = 0,7$  мс (далее  $MR_0$ ) [6]. Общая продолжительность одного измерения составляла 60 с. Динамика ЗФ отражала изменения интенсивности свечения на шкале 0,1–0,9 мс в интервалах между импульсами действующего света. Характеристики и протокол измерений на приборе М-РЕА-2 был подробно описан ранее [9–11]. Перед началом измерений образцы водорослей концентрировали на мембранном фильтре и выдерживали в темноте в течение 10 мин во влажном состоянии.

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров индукционной кривой флуоресценции был использован так называемый JIP-тест [6,9,12]. JIP-тест использует следующие параметры кинетической кривой индукции флуоресценции: интенсивность 20 мкс ( $F_0$ ), 2 мс ( $F_J$ ), 30 мс ( $F_I$ ), 6 с ( $F_{6s}$ ), а также  $F_p$  ( $F_M$ , максимальная интенсивность флуоресценции) и  $Area$  (площадь над кинетической кривой OJIP но ниже уровня  $F_M$ ).

Эти измеряемые величины использовали для расчета следующих параметров:

$F_V = F_M - F_0$  – максимальная переменная флуоресценция;

$F_V/F_M$  – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФС II:  $F_V/F_M = \Phi_{P_0} = TR_0/ABS$ ;

$\Phi_{E_0}$  – квантовый выход электронного транспорта (при  $t = 0$ ):  $\Phi_{E_0} = ET_0/ABS = (TR_0/ABS) \cdot (ET_0/TR_0) = [1 - (F_0/F_M)] \cdot (1 - V_J)$ , где  $V_J = (F_J - F_0)/F_V$ ;

$\Phi_{D_0}$  – квантовый выход рассеивания энергии:  $\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{P_0} = (F_0/F_M)$ ;

$ABS/RC$  – поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром, характеризует относительный размер антенны:  $ABS/RC = (TR_0/RC)/(TR_0/ABS) = M_0/V_J(1/\Phi_{P_0}) = (M_0/V_J)/[(F_M - F_0)/F_M]$ ;

$PI_{ABS}$  – индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии:  $PI_{ABS} = [1 - (F_0/F_M)] \cdot (M_0/V_J) \cdot [(F_M - F_0)/F_0] \cdot [(1 - V_J)/V_J]$ ;

$q_E$  – способность к рН-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции:  $q_E = (F_M - F_{6s})/F_V$ ;

$S_M$  – нормированная площадь над кривой OJIP, отражает общий объем пула переносчиков электронов от времени  $t = 0$  до времени  $t_{F_M}$  (время достижения максимума флуоресценции  $F_M$ ):  $S_M = Area/F_V$ .

Спектр поглощения света в пробах определяли на двухволновом спектрофотометре HITACHI 557 (Hitachi, Япония). Измерения спектров возбуждения флуоресценции проводились на спектрофлуориметре Fluorolog<sup>®</sup>-3 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Франция) с опцией TCSPC (time correlated single photon counting). Измерение флуоресценции проводили на длине волны 685 нм при возбуждении импульсным свето-

диодом LED (light emission diode) от 390 до 700 нм.

Все измерения проводили не менее чем в пяти повторностях. На рисунках представлены данные средних значений.

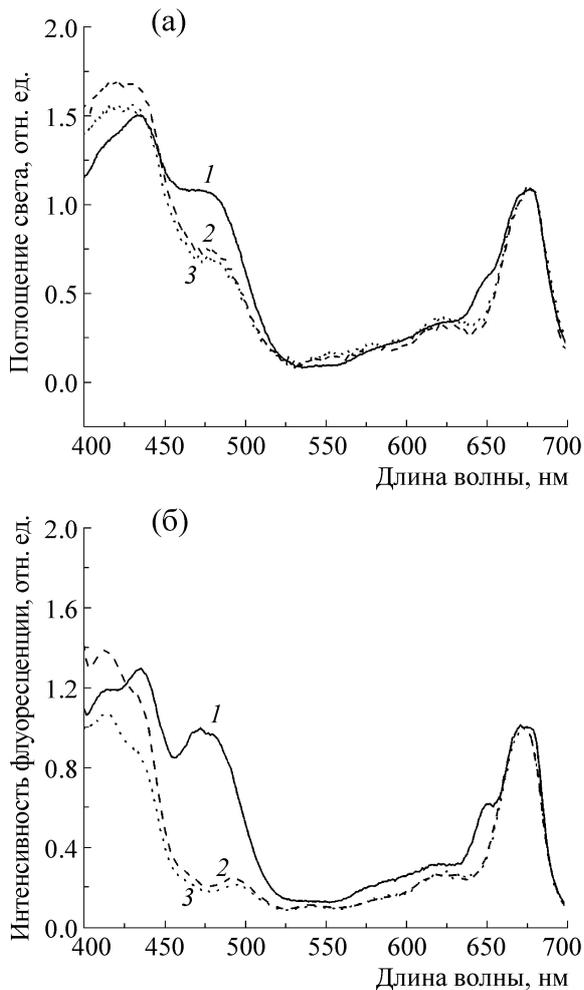
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные в фотоавтотрофных условиях клоны представлены пигментными мутантами светло-зеленого цвета, которые были обозначены как СС-124у-1, СС-124у-2 и СС-124р-2. Все штаммы были близки по культурально-морфологическим характеристикам и имели размер от 2,0 до 3,5 мм и образовывали на твердой среде колонии светло-зеленого цвета. Штаммы имели два жгутика одинаковой длины, расположенные на переднем конце клетки. Весь хлорофилл был сосредоточен в хроматофоре. Культуры хорошо росли при температуре воздуха 22–30°C на жидких и агаризованных питательных средах L-min в фотоавтотрофных условиях.

На рис. 1 приведены спектры поглощения дикого штамма *Chl. reinhardtii* и мутантных штаммов СС-124у-2 и СС-124р-2. Штамм СС-124у-1 был описан нами в предыдущей работе [13]. Эти спектры нормированы на красный максимум поглощения хлорофилла *a* при 675 нм. У мутантных штаммов СС-124у-2 и СС-124р-2 по сравнению с диким типом наблюдается значительное снижение поглощения в области 450–500 нм, что указывает на снижение в несколько раз количества хлорофилла *b* по сравнению с хлорофиллом *a*. Это также подтверждается данными, полученными при измерении спектров возбуждения флуоресценции (рис. 1б).

На спектрах поглощения у мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 отмечалось уменьшение в области каротиноидов (450–500 нм) (рис. 1а). Аналогичные изменения были еще сильнее выражены в спектрах возбуждения флуоресценции (рис. 1б). Это показывает, что у мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 существенно снижено содержание каротиноидов.

Известно, что каротиноиды в водорослях не флуоресцируют, но эффективно переносят энергию возбуждения на хлорофилл *a*, который является основным источником флуоресценции. Более существенное уменьшение при длине волны 450–500 нм в спектре возбуждения флуоресценции по сравнению со спектрами поглощения света у мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 указывает на то, что у них ослаблена связь каротиноидов с хлорофиллом *a*, который испускает флуоресценцию.



**Рис. 1.** Спектры поглощения (а) и возбуждения флуоресценции (б) клеток дикого типа *Chl. reinhardtii* (СС-124) (1) и мутантных штаммов: СС-124р-2 (2) и СС-124у-2 (3). Спектры нормированы на красный максимум хлорофилла *a* при длине волны 675 нм.

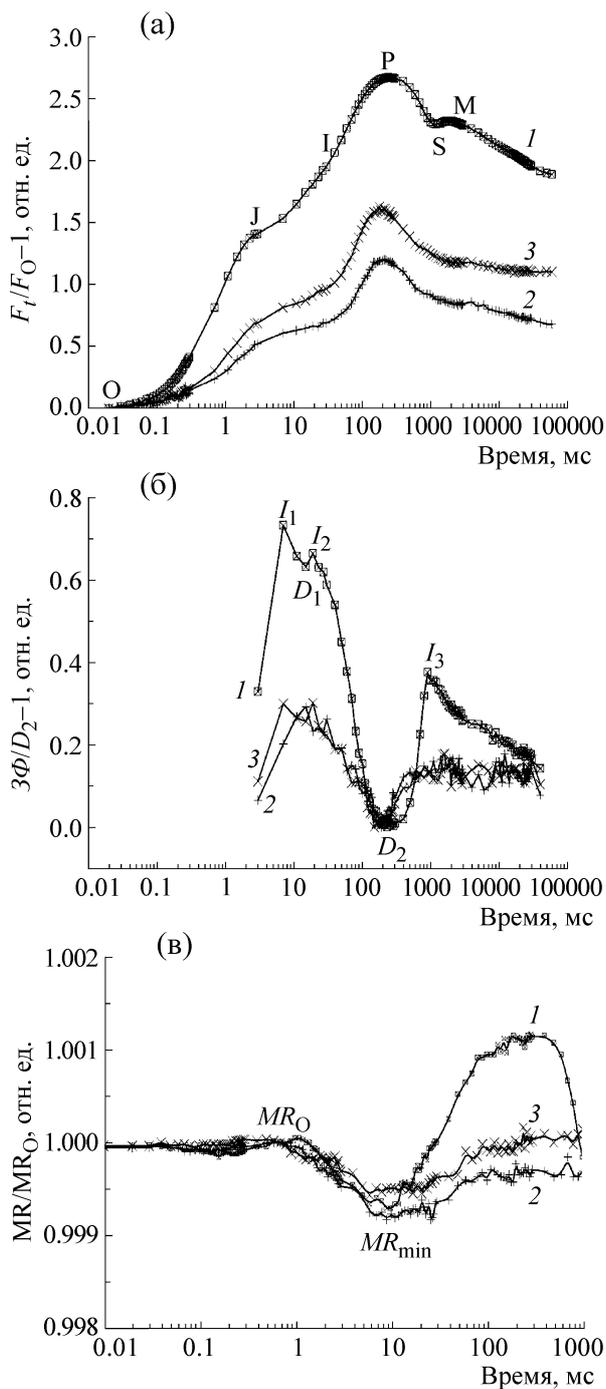
Измерение соотношения интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтезе свете ( $F_M$ ) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата ( $F_O$ ) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов ФС II, которая равна  $(F_M - F_O)/F_M = F_V/F_M$  [8]. Параметр  $F_V/F_M$  представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия. Исследования *Chl. reinhardtii* показали, что максимальный квантовый выход первичной фотохимии  $F_V/F_M$  ( $\phi_{P_0}$ ) у дикого типа находится на высоком уровне (0,728). Напротив, у мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 параметр  $F_V/F_M$  немного снижен.

Для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей в последнее время начинают использовать методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) при возбуждении интенсивным светом [5,6]. Измерение индукционных кривых флуоресценции с высоким разрешением занимает всего несколько секунд и проводится на приборах типа РАМ или РЕА. На приборе М-РЕА-2 появилась возможность наряду с регистрацией флуоресценции хлорофилла измерять одновременно модулированное отражение при длине волны 820 нм, который позволяет оценить редокс-состояние пигмента Р700 реакционного центра ФС I. То есть прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями ФС II и ФС I и проводить регистрацию индукционных изменений замедленной флуоресценции [5,6,9].

Для детальной оценки изменений фотосинтетического аппарата в клетках мутантов были измерены индукционные параметры быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния Р700. На рис. 2а представлены кинетические кривые индукции быстрой флуоресценции, нормированные к  $F_O$ . У контрольных клеток дикого типа кривая флуоресценции соответствовала кривой, описанной в литературе [9,12]. В кинетике индукции быстрой флуоресценции при действии света наблюдается несколько стадий, известных как О–J–I–P-переходы [9]. Начальный уровень О соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при «открытых» реакционных центрах ФС II ( $F_O$ ), когда все акцепторы  $Q_A$  окислены. Фаза О–J обусловлена светоиндуцированным восстановлением акцептора  $Q_A$ , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного  $Q_A^-$ , обусловленное снижением его ре-окисления в результате восстановления акцепторов  $Q_B$  и пула хинонов.

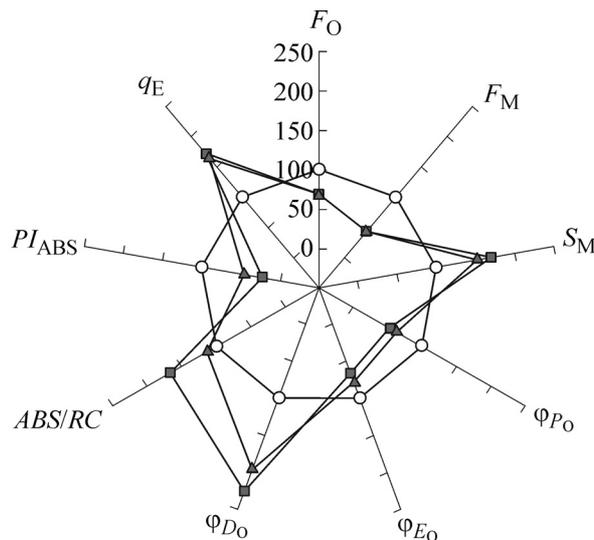
Полученные индукционные кривые флуоресценции у мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 отличаются от дикого типа. У мутантных штаммов наблюдалось снижение переменной флуоресценции  $F_V$  ( $F_V = F_M - F_O$ ) в основном за счет снижения максимального уровня флуоресценции  $F_M$ . Для проведения количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров кинетической кривой О–J–I–P использовали «JIP-тест» (рис. 3), параметры которого описаны в разделе «Материалы и методы».

Параметр  $ABS/RC$  у мутантных клеток СС-124у-2 и СС-124р-2 увеличен относительно клеток дикого типа, что связано с снижением у них



**Рис. 2.** Индукционные кривые быстрой флуоресценции (а), замедленной флуоресценции (б) и изменение в отражении при длине волны 820 нм (в) у клеток дикого типа *Chl. reinhardtii* (СС-124) (1) и мутантных штаммов СС-124р-2 (2) и СС-124у-2 (3). Быстрая и замедленная флуоресценция нормированы на  $F_0$  и  $D_2$  соответственно. Интенсивность действующего красного света 1300 мкЕ/м<sup>2</sup>·с. Одновременные измерения всех трех сигналов выполнены на приборе М-РЕА-2.

доли активных реакционных центров относительно поглощаемого света. Квантовый выход



**Рис. 3.** Диаграмма параметров ЛР-теста индукционной кривой быстрой флуоресценции у темно-адаптированных клеток дикого типа *Chl. reinhardtii* (СС-124) (кружки) и мутантных штаммов: СС-124р-2 (квадраты) и СС-124у-2 (треугольники). Все параметры нормированы относительно клеток дикого типа, значения приведены в процентах.

электронного транспорта в ФС II у мутантных штаммов снижен ( $\Phi_{E_0}$ ). Параметр  $S_M$  у мутантов выше, чем у дикого типа, этот параметр отражает относительный размер пула акцепторов электронов в ФС II.

Параметр  $PI_{ABS}$  является показателем функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии. Это параметр имеет более высокие показатели у клеток дикого типа по сравнению с мутантными штаммами. Низкие показатели параметра  $PI_{ABS}$  у мутантов указывают на низкую функциональную активность ФС II в основном из-за снижения доли активных реакционных центров и повышения тушения возбужденных состояний в антенне виде тепла (параметр  $\Phi_{D_0}$ ). Уменьшение эффективности передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на реакционный центр должно сопровождаться увеличением рассеивания неиспользуемой световой энергии. Действительно, квантовая эффективность рассеивания энергии ( $\Phi_{D_0}$ ) у мутантов находится на высоком уровне. Это коррелирует с увеличением у них  $\Delta pH$ -зависимого нефотохимического тушения  $q_E$ , которое рассчитывается по спаду флуоресценции после достижения максимума ( $q_E = (F_M - F_{6s})/F_V$ ).

Одновременное измерение модулированного отражения при 820 нм показывает, что у

адаптированного к темноте объекта имеет место фотоиндуцированное окисление P700. Максимум накопления P700<sup>+</sup> наблюдали при  $t \approx 30$  мс ( $MR_{\min}$ ), далее происходило восстановление P700 (рис. 2б). При этом сигналы флуоресценции, отражающие восстановление  $Q_A$ , и процессы восстановления P700 выходят на плато примерно синхронно. Параллельное накопление восстановленных форм P700 и  $Q_A$  отражает восстановление переносчиков на всем участке электрон-транспортной цепи между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФС I в условиях, когда ферредоксин-НАДФ-редуктаза инактивирована инкубацией в темноте. При длительном освещении ( $\sim 1-10$  с) наблюдали вторую волну окисления P700, которую можно объяснить оттоком электронов от ФС I при активации ферредоксин-НАДФ-редуктазы и ферментов цикла Кальвина.

Как видно из рис. 2в, у мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 сохраняется способность P700 к окислению при включении света. Однако у них наблюдалось снижение скорости восстановления P700 от ФС II. Это согласуется с данными анализа индукционных кривых быстрой флуоресценции.

Миллисекундная замедленная флуоресценция возникает в результате вторичной реакции рекомбинации, и интенсивность ее зависит от величины электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране, энергия которого снижает энергию активации реакции обратной рекомбинации [5,6]. Поэтому ЗФ является одним из методов, который позволяет следить за изменением градиента протонов мембраны клетки. Максимум на кривой ЗФ в миллисекундном диапазоне ( $I_1$ ) совпадает с фазой возрастания J-I на индукционной кривой быстрой флуоресценции (рис. 2а). Образование пиков  $I_1$  и  $I_2$  обусловлено накоплением определенных излучательных редокс-состояний, отвечающих за обратную рекомбинацию зарядов и испускание квантов ЗФ (т.е. высвечивающие состояния), а также усилением ЗФ за счет образующегося электрического потенциала на мембране ( $\Delta\psi$ ). Третий пик  $I_3$  – в секундном диапазоне – связывают с фотоиндуцированным образованием трансмембранного градиента протонов ( $\Delta pH$ ), который также снижает энергию активации излучательных переходов (испускание ЗФ) в реакционном центре ФС II. Эти закономерности рассмотрены во многих работах [5,6].

У мутантов СС-124у-2 и СС-124р-2 снижена интенсивность ЗФ на индукционной кривой при временах 10–50 мс (пики ЗФ  $I_1$  и  $I_2$ ), и 1 с

(пик ЗФ  $I_3$ ) (рис. 2б), что, вероятно, связано со значительным уменьшением нециклического транспорта и соответственно уменьшением энергизации фотосинтетических мембран.

Таким образом, одновременная регистрация индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также изменений редокс-состояний P700 на М-РЕА-2 позволила проследить за отдельными реакциями накопления восстановленных переносчиков между фотосистемами, включением ФС I и кинетикой электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране у мутантов.

Методика измерения световых кривых параметров флуоресценции в настоящее время все шире используется в эколого-физиологических исследованиях фотосинтеза [5,8]. Квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС II на свету определяется как отношение  $Y = (F'_M - F_t)/F'_M$ . На основании параметра  $Y$  можно рассчитать относительную скорость нециклического электронного транспорта (ETR) при умножении интенсивности освещения на коэффициент  $Y$  (см. методику). На рис. 4а представлены световые зависимости относительного ETR у водорослей. В диапазоне интенсивностей до 200 мкЕ/м<sup>2</sup>·с у мутантов наблюдалось уменьшение относительного ETR по сравнению с контролем. Однако в диапазоне интенсивности действующего света 400–800 мкЕ/м<sup>2</sup>·с ETR у обоих мутантов было несколько выше, чем у дикого типа. Последнее показывает, что в стационарных условиях при средних освещенностях у мутантов сохраняется достаточный уровень электронного транспорта. По световым зависимостям можно оценить коэффициент максимальной утилизации световой энергии, угол наклона  $\alpha$  на линейном участке световой кривой. У мутантов наблюдалось снижение коэффициента  $\alpha$  максимальной утилизации световой энергии, что согласуется с изменениями в электрон-транспортной системе, зарегистрированными по индукционным кривым флуоресценции.

Снижение квантового выхода фотохимии ФС II –  $Y$  при увеличении освещенности у водорослей связано с увеличением тепловой диссипации сброса избыточной световой энергии, когда энергия не способна утилизироваться в световых реакциях. Этот процесс отражается в развитии нефотохимического тушения флуоресценции на действующем свету и рассчитывается по формуле  $NPQ = (F'_M/F'_M) - 1$  [8]. Величина нефотохимического тушения  $NPQ$  значительно уменьшалась у мутантных клеток в области низких интенсивностей действующего

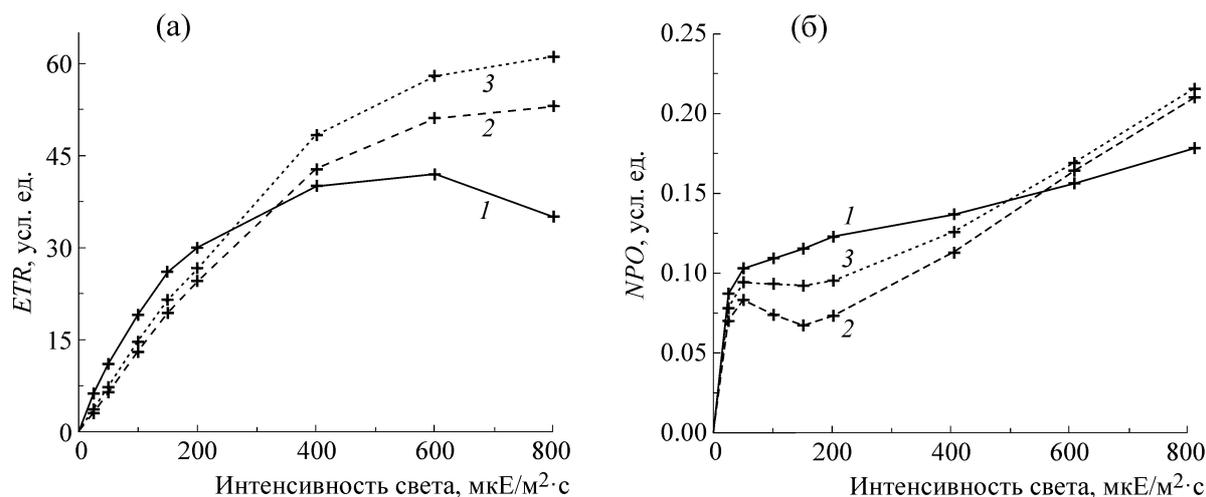


Рис. 4. Изменения параметров флуоресценции в зависимости от интенсивности действующего света у дикого типа *Chl. reinhardtii* СС-124 (1) и мутантных штаммов: СС-124р-2 (2) и СС-124у-2 (3). (а) – Относительная скорость электронного транспорта *ETR*, (б) – нефотохимическое тушение *NPQ*.

света до 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  и увеличивалось в диапазоне 400–800  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Важно отметить, что это коррелирует с увеличением  $\Delta\text{pH}$ -зависимого нефотохимического тушения  $q_E$  (см. рис. 2).

**Пример изучения генетической токсичности различных вод с использованием полученных мутантов.** Полученные цветные мутанты могут быть использованы в биомониторинге природных и сточных вод. Примером возможного использования полученных штаммов являются работы по выявлению генетической токсичности стоков автомойки г. Алматы и сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода (таблица). В этих исследованиях клетки дикого типа и мутантного штамма СС-124у-2 водоросли *Chl. reinhardtii* выдерживали в тестируемой воде, затем рассматривали частоту возникновения прямых у дикого типа и обратных мутаций (ревертантов) у штамма СС-124у-2. Ревертант – это мутант, у которого в результате обратной супрессорной или компен-

саторной мутации полностью или частично восстанавливаются признаки исходного (дикого) организма, в частности зеленая окраска клеток.

Для расчета использовали метод макроколоний. Это обычный микробиологический метод, заключающийся в том, что для учета выживаемости и количества мутаций на поверхность питательной среды в чашки Петри высевается определенное количество клеток из расчета 200–500 клеток на чашку. Посеянный на чашки материал выставляли в люминостат. Через 7–10 сут проводили определение количества выживших колоний хламидомонад (КОЕ/мл) и учитывали долю мутантных клонов по цвету колоний [14]. При действии сточных вод автотранспортных моек города Алматы не выявились пигментные мутанты дикого типа и ревертанты пигментного мутанта (таблица). Это указывает на то, что исследуемые пробы не проявляют мутагенной активности в отношении *Chl. reinhardtii*.

Изучение генетической токсичности смывных вод автотранспортных моек города Алматы и сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода с использованием дикого типа и мутантного штамма СС-124у-2 водоросли *Chl. reinhardtii*

Объект	Частота встречаемости	Контроль (число колоний)	Эксперимент (№ пробы), число колоний из $10^5$	
			1	2
Сточные воды автотранспортных моек города Алматы	Пигментные мутанты дикого типа	0	0	0
	Ревертанты мутантного штамма	0	0	0
Сточные воды Павлодарского нефтеперерабатывающего завода	Пигментные мутанты дикого типа	0	$9 \pm 1$	$26 \pm 1$
	Ревертанты мутантного штамма	0	$28 \pm 1$	$63 \pm 2$

При добавлении проб сточных вод Павлодарского нефтеперерабатывающего завода зарегистрировано появление прямых мутантов и ревертантов по изменению цвета, что свидетельствует о мутагенной активности сточных вод этого завода. Таким образом, проведенные исследования показали перспективность использования полученных светло-зеленых мутантов с низким содержанием хлорофилла *b* в оценке экологического состояния различных вод и отходов производства.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Система оценки качества воды на основе микроводорослей является перспективной и может быть в дальнейшем усовершенствована за счет разработки новых мутантных штаммов, а также расширения спектра используемых мутантов, например, штаммов без хлорофилла *b*, безоболочных, светочувствительных, с нарушениями в системе репарации клетки [14–16].

Подобные перспективные мутанты с пониженным содержанием хлорофилла *b* были получены и описаны в настоящей работе. Исследования, проведенные с помощью М-РЕА-2, позволили выявить особенности изменений реакции в ФС II и реакции окисления P700 у этих штаммов. Одновременная регистрация в микросекундном интервале индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния P700 на приборе М-РЕА-2 выявила уменьшение квантового выхода электронного транспорта в ФС II ( $\Phi_{E_0}$ ), индекса производительности ( $PI_{ABS}$ ), а также увеличение квантовой эффективности рассеивания энергии ( $\Phi_{D_0}$ ) и  $\Delta pH$ -зависимого нефотохимического тушения ( $q_E$  и NPQ).

Световые зависимости параметров флуоресценции подтвердили изменения в электрон-транспортной цепи у мутантов. У них наблюдалось снижение коэффициента  $\alpha$  максимальной утилизации световой энергии. Однако при средних освещенностях в стационарных условиях мутанты показывают достаточную скорость электронного транспорта. Обнаружено отсутствие прямого действия мутаций на реакции окисления пигмента ФС I – P700 и уменьшение замедленной флуоресценции.

Данные настоящей работы показывают, что изменение индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции является одним из первых быстрорегистрируемых параметров клеток микроводоросли после мутагенеза. Эти параметры могут быть весьма эффективно использованы для диагностики состояния иссле-

дуемых объектов. Эти результаты могут быть полезными не только для понимания механизмов регуляции первичных процессов в ФС II и ФС I, но и для использования различных параметров флуоресценции в биотестировании свойств воды в естественных и искусственных водоемах. Кроме того, полученные пигментные мутанты без хлорофилла *b* перспективны в оценке экологического состояния загрязненных водных экосистем. Применяемый генетический критерий, пигментный состав, является неопределимым преимуществом для использования данных мутантов в генетическом мониторинге окружающей среды с целью определения мутабельности исследуемой среды.

Использование полученных мутантов на загрязненных водах на объектах Казахстана подтвердило перспективность применения их в биомониторинговых исследованиях на наличие мутагенов.

Авторы благодарят сотрудника кафедры биофизики МГУ Е.П. Лукашева за помощь в проведении спектральных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Казахстанского фонда фундаментальных исследований (проект № ГФ2015, № госрегистрации 015РК00290), Министерства образования и науки Казахстана (грант № 1582/ГФ4 для Б.К. Заядана) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-0400143).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Б. К. Заядан и Д. Н. Маторин, *Биомониторинг водных экосистем на основе микроводорослей* (Альтекс, М., 2015).
2. Н. С. Жмур и Т. Л. Орлова, *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 Акварос, М., 2007).
3. Ю. С. Григорьев и Е. С. Стравинскене, *Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления* (ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09, ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.14-09, 2014).
4. Д. Н. Маторин, В. А. Осипов и А. Б. Рубин, *Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты. Учебно-методическое пособие* (Альтрекс, М., 2012).
5. Д. Н. Маторин и А. Б. Рубин, *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей* (ИКИ-РХД, Ижевск – М., 2012).

6. В. Н. Гольцев, М. Х. Каладжи, М. А. Кузманова и С. И. Аллахвердиев, *Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений* (ИКИ-РХД, Ижевск – М., 2014).
7. В. К. Zaydan, А. К. Sadvakasova, М. М. Saleh, and М. М. Gaballah, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2** (12), 64 (2013).
8. U. Schreiber, in: *Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Ed. by G. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, Netherlands, 2004), pp. 279–319.
9. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, S. Qiang, and V. Goltsev, *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1313 (2010).
10. А. А. Булычев, V. А. Osipov, D. N. Matorin, and W. J. Vredenberg, *J. Bioenerg. Biomembr.* **45**, 37 (2013).
11. В. В. Ленбаум, А. А. Булычев и Д. Н. Маторин, *Физиология растений* **62** (2), 210 (2015).
12. D. Lazar and G. Schansker, in: *Photosynthesis in Silico* (Springer, Netherlands, 2009), pp. 85–123.
13. А. К. Садвакасова, Н. Р. Акмуханова, Б. К. Заядан и др., *Физиология растений* **63** (4), (2016).
14. К. В. Квитко, И. А. Захаров и В. И. Хропова, *Генетика*, № 2, 148 (1966).
15. G. Mijlt, В. К. Zayadan, E. Rahman, et al., *Acta Genetica Sinica* **30** (7), 646 (2013).
16. А. В. Столбова, Ю. В. Наконечный, О. Н. Мирная и В. В. Тугаринов, *Вестн. Санкт-Петербургского университета* **3** (4), 111 (1995).

## **Study of Biophysical Characteristics of Pigment Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Using the M-PEA-2 Fluorometer**

**D.N. Matorin\***, **F.F. Protopopov\* \*\***, **A.K. Sadvakasova\*\*\***, **A.A. Alekseev\*\***,  
**L.B. Bratkovskaja\***, and **B.K. Zayadan\*\*\***

\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

\*\*Institute of Physics and Technology, Ammosov North-Eastern Federal University,  
ul. Kulakovskogo 48, Yakutsk, 677000 Russia

\*\*\*Al-Farabi Kazakh National University, ul. al-Farabi 71, Almaty, 050040, Republic of Kazakhstan

Light green pigment mutants of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard with a reduced chlorophyll *b* content were obtained. Simultaneous recording of induction curves of the prompt and delayed fluorescence and the redox state of P700 in the microsecond range with an M-PEA-2 revealed a decrease in the quantum yield of electron transport in PS2 ( $\phi_{E_0}$ ) and performance index ( $PI_{ABS}$ ), as well as an increase in the quantum efficiency of energy dissipation ( $\phi_{D_0}$ ) and  $\Delta pH$ -dependent non-photochemical quenching ( $q_E$  and NPQ). Light dependence curves of fluorescence parameters confirmed a decrease in the coefficient of the maximum utilization of light energy ( $\alpha$ ) in the mutants. However, at medium illumination under steady-state conditions, the mutants showed an adequate rate of electron transport. The mutations had no direct effect on oxidation reactions of PS1 pigment – P700 and on the decrease in delayed fluorescence. The use of the obtained mutants in polluted waters in Kazakhstan confirmed prospects of their use in biomonitoring studies for the presence of mutagens.

*Key words:* prompt and delayed chlorophyll *a* fluorescence, biomonitoring, *Chlamydomonas reinhardtii*, JIP-test, M-PEA-2