
ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ СУЛЬФАТА МЕДИ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* *

Д.А. Тодоренко¹, Д.Н. Маторин¹, А.А. Алексеев¹,
Д.И. Тунгатарова¹, В.С. Орлова²

¹Биологический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, д. 1, корп. 42, Москва, Россия, 119992

²Экологический факультет

Российский университет дружбы народов
Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 113093

В статье рассматриваются изменения параметров флуоресценции фотосинтетического аппарата водорослей *Scenedesmus quadricauda* при действии сульфата меди и наночастиц серебра. Показано, что световые зависимости фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции могут быть использованы как высокочувствительный тест для выявления изменений на ранних стадиях воздействия на водоросли солей тяжелых металлов.

Ключевые слова: *Scenedesmus Quadricauda*, сульфат меди, наночастица серебра, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, экология.

Большинство веществ, поступающих в водоемы с промышленными и бытовыми стоками, оказывают острое токсическое действие на микроводоросли. В связи с этим микроводоросли выбраны в качестве основных биотестов при нормировании качества вод [5]. В современной практике широко используются стандартизированные методы биотестирования на пресноводных зеленых микроводорослях рода *Scenedesmus* и *Chlorella*, культивируемых по общепринятой методике. Основными показателями токсического действия являются рост и выживаемость культуры. Между тем оценка токсичности вод и в особенности питьевой воды по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции является чрезвычайно актуальной. Флуориметры позволяют регистрировать различные параметры флуоресценции хлорофилла культур водорослей, поскольку флуоресценция отражает состояние фотосинтетического аппарата, являющегося наиболее чувствительным к действию многих веществ, поступающих в водные экосистемы. Основными преимуществами использования флуоресценции в биотестировании являются экспрессность анализа, низкая трудоемкость процесса измерения. Обзор по действию различных токсикантов на флуоресценцию водорослей приведен в [6]. В настоящее время флуоресцентные методы включены в методы биотестирования [3] и биомониторинга для контроля качества природных вод [4].

Флуоресценция водорослей в качестве биосенсоров, по-видимому, может с успехом использоваться для тестирования тяжелых металлов. Соли меди обладают высокой токсичностью, способны накапливаться в организмах и передаваться

* Статья поддержана Грантом РФФИ № 13-04-01853.

по трофической цепи. Кроме того, 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. Наиболее чувствительным к действию солей меди среди всех метаболических процессов, происходящих внутри растительной клетки, является фотосинтез [6]. Ранее было показано, что соединения меди ингибируют световые и темновые реакции фотосинтеза [7—9]. Основным механизмом действия таких соединений является ингибирование мембранных процессов в результате взаимодействия с SH-содержащими соединениями и дисульфидными группами белков, а также замещение коферментов [10]. Ионы меди в более высоких концентрациях ингибируют восстановление фотосистемы 2 (ФС 2), а также электронный транспорт в ФС 2 на донорной и акцепторной стороне мембраны [7]. В последнее время все шире начинают использовать серебросодержащие материалы, в том числе и наночастицы серебра (нч Ag) при изготовлении различных товаров.

Целью данной работы явилось исследование токсического действия солей меди и наночастиц серебра на фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции микроводорослей и выявление наиболее информативных показателей оценки состояния клеток при токсическом воздействии.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для исследований выбраны альгологически чистые культуры одноклеточных пресноводных водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb, выращенные на среде Успенского-1 в соответствии с методикой [5]. До начала экспериментов водоросли культивировали при температуре 24 ± 2 °С и периодическом освещении (12 час. свет $30 \text{ мЕ/м}^2\text{с}$; 12 час. темнота).

В эксперименте использовали водный раствор сульфата меди $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, для которого характерен сине-голубой цвет, свойственный гидратированным ионам $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, и наночастицы серебра (80 нм). После добавления токсиканта (в разных концентрациях исследуемых металлов) водоросли экспонировали сутки при таких же условиях, что и при выращивании культуры с орбитальным перемешиванием с использованием шейкера.

Измерения флуоресцентных показателей водорослей проводили на импульсном флуорометре WaterPAM (Walz, 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 2).

Измерения световых зависимостей различных параметров флуоресценции на свету выполнялись при последовательном увеличении интенсивности от 0 до $800 \text{ мкЕ/м}^2\text{с}$ [11]. Время освещения составляло 50 сек. В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности с использованием насыщающей вспышки (0,8 с, $3000 \text{ мЕ/м}^2\text{с}$) регистрировались 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 фотосистеме 2 (ФС 2) 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, $\mu E/m^2 \text{ c}$). На основании полученных световых кривых ETR оценивали следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи (ETR_{\max}) и насыщающую интенсивность света (E_n). α рассчитывали как коэффициент линейной регрессии, построенной по точкам, лежащим на светолимитированном участке P/E кривой, ETR_{\max} — как среднее по значениям ETR , находящимся на светонасыщающем участке. E_n рассчитывали по формуле $E_n = ETR_{\max} / \alpha$. Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой [9].

Результаты и обсуждение. Известно, что величина Fv/Fm является потенциальным квантовым выходом фотохимии ФС 2, которая связана с разложением воды и выделением кислорода [11]. Измерения величины Fv/Fm проводили в процессе инкубации водорослей в течение 24 ч при различных концентрациях сульфата меди и наночастиц серебра. Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что сульфат меди в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-5}$ М и наночастицы серебра ($5 \cdot 10^{-5}$ М) вызывали инактивацию ФС 2 по параметру Fv/Fm , что согласуется с данными о токсическом действии этих веществ [7—9].

Наиболее контрастные различия у водорослей при действии сульфата меди были выявлены через сутки при измерении и анализе параметров флуоресценции на свету при разной интенсивности, т.е. в условиях увеличивающейся световой нагрузки (рис., табл.). Методика измерения световых кривых в настоящее время все шире используется в эколого-физиологических исследованиях фотосинтеза [1].

Квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС 2 на свету определяется как отношение $Y = (Fm' - Ft)/Fm'$. Значения этого параметра варьируют от 0,7 (адаптированный к темноте объект) до величин близких к 0 (при нарушении процесса фотосинтеза). На листьях показана линейная корреляция между параметром Y и квантовым выходом фиксации углекислого газа [11]. В адаптированном к темноте объекте значение Y равно Fv/Fm , которое является потенциальным квантовым выходом фотохимии ФС 2. Показано, что при возрастании освещенности растений или водорослей происходит снижение фотохимического тушения и квантового выхода в ФС 2 (Y) из-за общего торможения электронного транспорта вследствие лимитирования последнего скоростью функционирования темновых процессов фотосинтеза и возрастание нефотохимического тушения [11]. В наших экспериментах увеличение интенсивности освещения контрольных клеток водорослей также приводило к снижению квантового выхода фотохимии ФС 2 - Y (рис.). Уменьшение этого параметра от интенсивности света существенно ускорялось при инкубации с солями меди. Интенсивность света при которой значение Y у контрольных клеток уменьшалось наполовину ($T_{1/2}$, $\mu E/m^2 \text{ c}$) составляло $150 \mu E/m^2 \text{ c}$ и оно составляло $30 \mu E/m^2 \text{ c}$ для клеток с сульфатом меди ($5 \cdot 10^{-5}$ М).

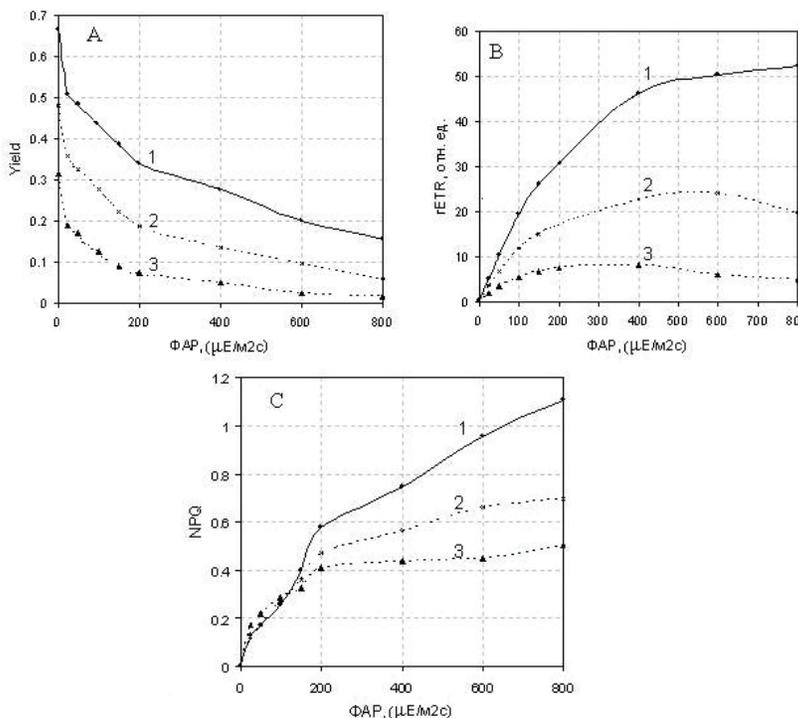


Рис. Изменения параметров флуоресценции в зависимости от интенсивности действующего света в суспензии клеток водорослей *Scenedesmus quadricauda* под воздействием CuSO_4 . Время инкубации 1 сутки:

A — квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в фотосистеме 2 как отношение $Y = (Fm' - Ft)/Fm'$; B — относительная скорость нециклического электронного транспорта; C — нефотохимическое тушение

$NPQ = (Fm/F'm) - 1$. (1) — контроль, (2), (3) — после добавления CuSO_4 в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$ М и $5 \cdot 10^{-5}$ М соответственно

Таблица

Изменение параметров световых зависимостей флуоресценции клеток *Scenedesmus quadricauda* в контроле и после добавления CuSO_4 и наночастиц серебра (нч Ag) (суточная инкубация)

Параметры световых кривых	Контроль	10^{-5} М CuSO_4	$2 \cdot 10^{-5}$ М CuSO_4	$5 \cdot 10^{-5}$ М CuSO_4	10^{-5} М нч Ag	$5 \cdot 10^{-5}$ М нч Ag
Fv/Fm	0,66	0,67	0,48	0,31	0,61	0,37
NPQ_{25} (при $\mu \text{E}/\text{m}^2 \text{c}$)	0,13	0,13	0,12	0,17	0,23	0,17
NPQ (при $400 \mu \text{E}/\text{m}^2 \text{c}$)	0,74	0,63	0,56	0,44	0,65	0,49
$rETR_{\text{max}}$ (отн. ед.)	52,4	49,8	24,1	8,2	47	28,2
α , угол наклона	0,21	0,21	0,14	0,07	0,20	0,1
E_{H} , ($\mu \text{E}/\text{m}^2 \text{c}$)	249	237	172	117	210	120

Fv/Fm — параметры проб в темноте; NPQ — нефотохимическое тушение; ФС 2. Параметры, описывающие зависимость электронного транспорта ($rETR$) от освещенности (световые кривые): максимальная относительная скорость нециклического транспорта электронов ($rETR_{\text{max}}$), коэффициент максимальной утилизации световой энергии, угол наклона световой кривой (α) и насыщающая интенсивность света (E_{H}).

На основании параметра Y можно рассчитать относительную скорость нециклического электронного транспорта (ETR) при умножении интенсивности освещения на коэффициент Y . На рисунке (см.) представлены световые зависимости относительного ETR водорослей в присутствии меди. В таблице (см.) приведены параметры, описывающие эти зависимости фотосинтетического электронного транспорта от освещенности: коэффициент максимальной утилизации световой энергии, угол наклона на линейном участке световой кривой (α), максимальная относительная скорость электронов по электрон транспортной цепи (ETR_{max}) и насыщающая интенсивность света (E_n). После обработки сульфатом меди наблюдалось снижение параметра ETR_{max} и коэффициента максимальной утилизации световой энергии (α). Насыщающая интенсивность света (E_n) для контрольных водорослей составляла $249 \mu E/m^2 \cdot c$. Для клеток, обработанных сульфатом меди в концентрациях $2 \cdot 10^{-5} M$ и $5 \cdot 10^{-5} M$, значения составляли 172 и 117 $\mu E/m^2 \cdot c$ соответственно.

Снижение квантового выхода фотохимии ФС 2 - 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 свете и рассчитывается по формуле $NPQ = (Fm/F'm) - 1$ [11]. При низкой интенсивности освещения значение нефотохимического тушения NPQ незначительно увеличивалось у клеток в присутствии с сульфатом меди (рис.). Однако при высокой освещенности наблюдалось ингибирование параметра NPQ в присутствии меди, который влияет на электрохимический градиент протонов, связанный с синтезом АТФ. Нефотохимическое тушение флуоресценции в образце с сульфатом меди полностью подавлялось присутствием меди, что соответствует действию метиламина ($10^{-3} M$), который является разобщителем фосфорилирования в тилакоидных мембранах.

Следует отметить, что при высоких интенсивностях света у обработанных токсикантами водорослей наблюдается процесс фотоингибирования электронного транспорта, что свидетельствует о повышении светочувствительности этих водорослей (см. рис.). Ранее нами отмечалось влияние светового фактора на развитие токсического эффекта для солей меди и ртути [2; 7].

Результаты исследования показывают, что токсикологический эффект действия солей меди и наночастиц серебра на водоросли выявляется по потенциальной активности ФС 2 (параметр Fv/Fm) и измерению быстрых световых зависимостей параметров флуоресценции. По характеристикам световых кривых возможно оценить коэффициент максимальной и минимальной утилизации световой энергии, относительную скорость электронов по фотосинтетической цепи электрон транспортной цепи (ETR_{max}) и диапазон насыщающих фотосинтез интенсивностей света. При этом световые зависимости параметров флуоресценции позволяют выявить состояния водорослей раньше и в большей степени по таким параметрам как максимальная относительная скорость электронов и насыщающая интенсивность света электронного транспорта при повышенных интенсивностях света в отличие от показателя Fv/Fm .

Таким образом, измерение быстрых световых зависимостей параметров флуоресценции может быть весьма эффективно использовано для диагностики влияния солей тяжелых металлов на водоросли, а также для раннего диагностирования появления этих загрязнений в среде.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. — М.: Природа, 2002.
- [2] *Тунгатарова Д.И., Венедиктов П.С.* Действие токсических загрязнений на характеристики флуоресценции хлорофилла водорослей // Обзор. ВИНТИ. 2008.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] *Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S.* Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // J Plant Physiol. 1995. V. 146. P. 609—614.
- [6] *Juneau P., Berdey A.El., Popovic R.* PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2002. V. 42. P. 155—164.
- [7] *Brack W., Frank H.* Chlorophyll *a* fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. V. 40. № 1—2. P. 34—41.
- [8] *Stojs S.J., Bagchi D.* Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // Free Rad. Biol. Med. 1995. V. 18. P. 321—336.
- [9] *Schreiber U.* (2004) Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method // In: Papageorgiou G and Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis, Springer, Dordrecht, The Netherlands. P. 279—319.
- [10] *Маторин Д.Н., Рубин А.Б.* Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. — М.: Ижевск: ИКИ-РХД, 2012.
- [11] *Маторин Д.Н., Осипов В.А., Сейфуллина Н.Х., Венедиктов П.С., Рубин А.Б.* Усиление токсического действия метилртути на микроводоросли *Chlorella vulgaris* в условиях светового и холодового стресса // Микробиология. 2009. Т. 78. № 3. С. 362—368.

LITERATURA

- [1] Rukovodstvo po opredeleniyu metodom biotestirovaniya toksichnosti vod, donnyx otlozhenij, zagryaznyayushhix veshhestv i burovyx rastvorov // Ministerstvo prirodnyx resursov RF RE'FIA. NIA. — М.: Priroda, 2002.
- [2] *Tungatarova D.I., Venediktov P.S.* Dejstvie toksicheskix zagryaznenij na karakteristiki fluo-rescencii xlorofilla vodoroslej // Obzor. VINITI. 2008.
- [3] Metodika opredeleniya toksichnosti vod, vodnyx vytyazhek iz pochv, osadkov stochnyx vod i otxodov po izmeneniyu urovnya fluorescencii xlorofilla i chislenosti kletok vodoroslej. FR.1.39.2007.03223 / N.S. Zhmur, T.L. Orlova. — М.: Akvaros, 2007.
- [4] Metodika izmerenij obiliya i indikacii izmeneniya sostoyaniya fitoplanktona v prirodnyx vodax fluorescentnym metodom / Matorin D.N., Osipov V.A., Rubin A.B. i dr. FR.1.39.2011.11246, PNDP14.2.268-2012. — М.: Al'treks, 2012.

- [5] *Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S.* Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // *J Plant Physiol.* 1995. V. 146. P. 609—614.
- [6] *Juneau P., Berdey A.El., Popovic R.* PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2002. V. 42. P. 155—164.
- [7] *Brack W., Frank H.* Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1998. V. 40. № 1—2. P. 34—41.
- [8] *Stohs S.J., Bagchi D.* Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. V. 18. P. 321—336.
- [9] *Schreiber U.* (2004) Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method // In: Papageorgiou G and Govindjee (eds) *Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Springer, Dordrecht, The Netherlands. P. 279—319.
- [10] *Matorin D.N., Rubin A.B.* Fluorescencii xlorofilla vysshix rastenij i vodoroslej. — M.; Izhevsk: IKI-RXD, 2012.
- [11] *Matorin D.N., Osipov V.A., Seifullina N.X., Venediktov P.S., Rubin A.B.* Usilenie toksicheskogo dejstviya metiltuti na mikrovodorosli *Chlorella vulgaris* v usloviyax svetovogo i xolodovogo stressa // *Mikrobiologiya.* 2009. T. 78. № 3. S. 362—368.

THE STUDY OF THE TOXICITY OF COPPER SULFATE AND SILVER NANOPARTICLES USING THE FLUORESCENCE OF ALGAE *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

D.A. Todorenko¹, D.N. Matorin¹, A.A. Alekseev¹,
D.I. Tungatarova¹, V.S. Orlova²

¹Department of Biophysics
Faculty of Biology
Lomonosov Moscow State University
Lenin Hills, 1, korp. 42, Moscow, Russia, 119992

²Ecological Faculty
Peoples' Friendship University of Russia
Podolskoye shosse, 8/5, Moscow, Russia, 113093

This paper discusses changes in fluorescence parameters of the photosynthetic apparatus of algae *Scenedesmus quadricauda* induced by copper sulfate and silver nanoparticles. It is shown that the light dependence curve of the photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching can be used as a highly sensitive test to detect changes during the early stages of the impact of heavy metals on the algae.

Key words: *Scenedesmus quadricauda*, copper sulfate, silver nanoparticles, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, ecology.