

<sup>1</sup>Д.Н. Маторин\*, <sup>1</sup>Д.А. Толоренко, <sup>1</sup>В.В. Ленбаум, <sup>2</sup>Б.К. Заядан

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва

<sup>2</sup>Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: matorin@biophys.msu.ru

### Влияние наночастиц серебра на фотосинтез зеленой водоросли

#### *Chlamydomonas reinhardtii*

Изучена острая токсичность наночастиц серебра (AgНЧ) на фотосинтез *Chlamydomonas reinhardtii*. Анализ индукционных кривых флуоресценции в присутствии низких концентраций AgНЧ показал ингибирование электронного транспорта в ФС2 и увеличение доли  $Q_B$ -невосстанавливающих центров. Обнаружено отсутствие прямого действия AgНЧ на реакции окисления пигмента ФС1 –  $P_{700}$  и влияние на процессы энергизации фотосинтетических мембран. Предлагается использовать параметры индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции для раннего обнаружения появления AgНЧ в среде.

**Ключевые слова:** *Chlamydomonas reinhardtii*, наночастицы серебра, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, экология.

D.N. Matorin, D.A. Todorenko, V.V.Lenbaum, B.K. Zayadan

#### The effect of silver nanoparticles on photosynthesis in green algae *Chlamydomonas reinhardtii*.

Acute toxicity of silver nanoparticles (AgNP) for photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* was studied using fluorometer MPEA2. Analysis of fluorescence induction curves in the presence of low concentrations of AgNP showed an inhibition of electron transport in PS2 and an increase in the fraction of  $Q_B$ -non-reducing centers. We found no direct effect of AgNP on oxidation reactions of  $P_{700}$  in PS1 and found an effect on energization processes in photosynthetic membranes. We propose to use the parameters of the prompt and delayed fluorescence for early detection of the appearance of AgNP in the environment.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, silver nanoparticles, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, ecology

При изготовлении различных товаров все шире используют серебросодержащие материалы, в том числе и металлические наночастицы серебра (AgНЧ). Появилось большое количество серебросодержащих медицинских препаратов, в которых используется AgНЧ. Существует вероятность того, что AgНЧ могут попасть в водные экосистемы и окажут токсическое действие на водные организмы. Обнаружено, что AgНЧ способны ингибировать фотосинтез у природного фитопланктона, который является основой биопродуктивности водоемов [1,2]. Токсичность ионов серебра для водорослей изучена в ряде работ [3]. Токсичное действие AgНЧ на пресноводные водоросли показано в работах [4].

Флуоресцентные методы используются для слежения за процессами фотосинтеза и дают информацию о начальных нарушениях на мембранном уровне клетки [1-5]. Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах водорослей, служит своего рода природным датчиком фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов флуоресценции. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтезе свете ( $F_m$ ) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата ( $F_0$ ) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов фотосистемы 2 (ФС2), которая равна  $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$ . Параметр  $F_v/F_m$  представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма.

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей, начинают использовать методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) [1-4]. На приборе М-РЕА2 появилась возможность наряду с регистрацией флуоресценции измерять изменения поглощения  $P_{700}$  (пигмента ФС1). То есть прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями ФС1 и ФС2 [11,12]. Более того, прибор регистрирует индукционные изменения замедленной флуоресценции, которые дают информацию о кинетике электрохимического градиента протонов на фотосинтетической мембране [4].

В настоящей работе проведены исследования процессов ФС1 и ФС2 и электрохимического градиента протонов на тиллакоидной мембране водорослей после воздействия AgНЧ.

#### Материалы и методы

Зеленые водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang c137+ выращивались фототрофно на триацетат-фосфатной среде при  $30 \text{ мкЕ/м}^2$  и температуре  $20^\circ\text{C}$ . Измерения флуоресцентных показателей водорослей проводили на приборе M-PEA2 (HansaTech, Англия), который позволяет одновременно регистрировать индукцию быстрой и замедленной флуоресценции, а также изменения  $P_{700}$  по поглощению при длине волны 820 нм с высоким временным разрешением (начиная с 0,01 мс) [5]. В опытах использовали препарат наночастиц серебра (Sigma-Aldrich). Средний размер частиц, определенный на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), составил около  $80 \pm 13$  нм.

#### Результаты и обсуждение

Флуоресцентные исследования подтвердили, что фотосинтетический аппарат водорослей *C. reinhardtii* является чувствительной мишенью для наночастиц серебра. После суточной инкубации водорослей с наночастицами серебра в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М активность ФС2 ( $F_v/F_m$ ) снижалась (таблица)

Для детального выяснения влияния AgНЧ на фотосинтетическую активность клеток водорослей на приборе M-PEA2 измерялись параметры быстрой и замедленной флуоресценции, а также  $P_{700}$ . Выполнение таких исследований важно не только для понимания первичных механизмов воздействия AgНЧ на работу ФС2 и ФС1 и на процессы энергизации фотосинтетических мембран, но и для возможного использования различных параметров флуоресценции в биомониторинговых исследованиях для выяснения токсикологического действия наночастиц серебра в водных системах.

В кинетике индукции флуоресценции водорослей в ответ на включение света наблюдается несколько компонент, т.е. O-J-I-P переходы [1,4,5]. Начальный уровень O соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при «открытых» РЦ ФС2 ( $F_o$ ), когда все  $Q_A$  окислены. Фаза O-J обусловлена светоиндуцированным восстановлением  $Q_A$ , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного  $Q_A$ , обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления акцепторов  $Q_B$  и пула хинонов.

При действии AgНЧ изменялась форма кривой O-J-I-P и наблюдалось снижение вклада фотохимической фазы J-I-P, что свидетельствует о нарушении потока электронов от ФС2 в пул хинонов. Для проведения количественного анализа на основе параметров кинетической кривой O-J-I-P использовали, так называемый, «JIP-тест» [1,4]. JIP-тест оперирует следующими параметрами кинетической кривой индукции флуоресценции: а) интенсивностью флуоресценции при 50 мкс ( $F_o$ ), 300 мкс ( $F_{300\text{мкс}}$ ), 2 мс ( $F_j$ ), 30 мс ( $F_i$ ), 6 с ( $F_{6\text{с}}$ ) и  $F_p$  ( $F_m$ ) – максимальный выход флуоресценции; б) временем достижения максимальной флуоресценции ( $tF_m$ ) и в) площадью над кинетической кривой до уровня  $F_m$ . Эти характеристики использовали для расчета параметров, приведенных в таблице.

Анализ показал, что при действии AgНЧ увеличивается количество  $Q_B$ -невосстанавливающих центров ФС2, неспособных восстанавливать пул хинонов (табл.). Соответственно, увеличивалось значение параметра  $M_o$ , который отражает начальный наклон кривой роста индукционной кривой и значение параметра  $S_m$ . Общий поток поглощенных фотонов пигментами антенны ФС2, нормированный на РЦ (ABS/RC) увеличивался в культурах, подверженных действию наночастиц серебра, относительно контрольного значения. В то же время относительная амплитуда фазы J-I ( $V_i$ ) мало изменялась.

Значение параметра  $q_E = (F_m - F_{6\text{с}}) / F_v$ , возникающего за счёт  $\Delta pH$  зависимо от нефотохимического тушения, уменьшалось в присутствии AgНЧ, что указывает на снижение энергизации мембран. В то же время способность пула хинонов тушить флуоресценцию  $q_{rO} = (F_m - F_j) / F_v$  у водорослей, обработанных AgНЧ, не изменялась.

Одновременное измерение кинетической кривой  $\Delta A_{820}$  показало, что в присутствии AgНЧ пигмент реакционного центра ФС1 –  $P_{700}$  способен к процессам окисления при включении света. Однако, у обработанных AgНЧ водорослей наблюдалось снижение скорости восстановления от ФС2 вследствие ингибирования электронного транспорта.

Известно, что замедленная флуоресценция (ЗФ) является одним из методов, который позволяет следить за изменением градиента протонов мембраны клетки [1]. В присутствии AgНЧ (при достаточно низких концентрациях) наблюдалось снижение пиков на кривой замедленной

флуоресценции в областях 20-50 мс и 1 с, что свидетельствует об уменьшении электрической (потенциал) и химической составляющих электрохимического градиента протонов на мембране хлоропласта.

Таким образом, одновременная регистрация индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также изменений  $P_{700}$  позволила следить за отдельными реакциями накопления восстановленных переносчиков между фотосистемами, включением ФС1 и кинетикой электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране в присутствии AgНЧ.

**Таблица** - Параметры ОИР-кинетики индукции флуоресценции, измеренной на клетках *Chlamydomonas reinhardtii* после 24 ч. инкубации с AgНЧ в разных концентрациях. Измерения кинетики индукции флуоресценции проводили на приборе M-PEA2 при освещении действующим светом с интенсивностью 1000 мкЕ/м<sup>2</sup>с.

Параметры ИР-теста		Контроль	AgНЧ 2 · 10 <sup>-6</sup> М	AgНЧ 2 · 10 <sup>-3</sup> М
$F_v/F_m$	Максимальный квантовый выход разделения зарядов в ФС2	0.71	0.69	0.66
$V_j$	Относительная амплитуда O-J фазы	0.39	0.41	0.43
$V_I$	Относительная амплитуда J-I фазы	0.67	0.68	0.68
$M_O$	Начальный наклон фазы O-J роста флуоресценции	0.86	0.90	0.93
$S_M$	Площадь между кинетической кривой флуоресценции (O-J-I-P) и уровнем $F_m$ , нормированная на величину $F_v$	19.11	19.78	20.9
ABS/RC	Среднее значение поглощенных потоков фотонов в РЦ ФС2 (или видимый размер активной антенны ФС2)	3.12	3.17	3.29
$q_E$	Способность к pH-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции	0.41	0.40	0.32
$q_{E0}$	Способность пула хинонов тушить флуоресценцию	0.33	0.32	0.32

Проведенные нами исследования показали, что одним из первых параметров реакций водоросли на появления наночастиц в среде являются изменения в индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции. Эти параметры могут быть весьма эффективно использованы для диагностики влияния наноматериалов на водоросли, а также для оперативного диагностирования появления наноматериалов в водной среде. Работа поддержана Грантом РФФИ-N 13-04-01853.

#### Литература

1. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей. – М. – Ижевск: ИКИ-РХД. – 2012. – 256 с.
2. Matorin D.N., Osipov V.A., Seifullina N.Kh., Zayadan B.K., Rubin A.B. Chlorophyll fluorescence changes as an indicator of nanomaterials toxic effects on natural phytoplankton // J. Water Chemis. 2012. – № 1. – P. 74–78.
3. Navarro E., Picciapietra F., Wagner B., Kogi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* // Environmental Science, Technology. 2008. – V. 42. P. 8959–8964.
4. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang Sheng, Golisev V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* // Biochim. Biophys. Acta. Biochim Biophys Acta. 2010. – V. 1797. № 6–7. – P. 1313–1326.
5. Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J. Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished  $\Delta pH$  and  $\Delta \psi$  components of the proton motive force // J. Bioenerg. Biomembr. 2013. – V. 45, № 1. – P. 37–45.