

кислорода и интенсивности биолюминесценции бактерий. Это позволяет предложить широко используемый и удобный биолюминесцентный тест для первичной оценки токсичности наноматериалов, используя не только живые культуры бактерий, но и стандартные лиофильно-высушенные биосенсоры системы «Эколюм».

The effect of a single-wall carbon nanotubes (carbon SWNT) on bacterial cells Escherichia coli K12 TG1 with cloned lux-operon of natural marine bacteria Photobacterium leiognathi was studied. Using atom force microscopy (AFM) bacterial cell morphological changes were revealed and cell viability decrease controlled by the number of colony-forming units was registered. It was shown that prior to these changes we can observe changes in the intensity of oxygen consumption and bacterial luminescence intensity. This allows to recommend well-known and easy-to-use bioluminescent test for initial testing of nanomaterial toxicity, using for this purpose living bacteria cultures as well as lyophilized biosensors «Ecolum».

УДК 574.64

Б.К. Заядан*, Д.Н. Маторин**, К. Болатхан***, А.К. Садвакасова*, А.А. Усербаева*,
А.Ж. Балтабекова*

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЗОЛОТА НА ПАРАМЕТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА МУТАНТОВ ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG

(* Казахский национальный университет имени аль-Фараби

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

*** Ийылдыз Технический Университет (Стамбул))

В данной статье представлена перспективность использования высокочувствительных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* для оценки токсикологического действия современных наноматериалов.

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

В настоящее время все возрастающее внимание во всем мире уделяется перспективам развития нанотехнологий. Использование нанотехнологий и наноматериалов бесспорно является одним из самых перспективных направлений науки и техники в XXI веке. Учитывая, что в перспективе ожидается тесный контакт человека и других биологических объектов с наноматериалами, изучение вопросов потенциальных рисков их использования представляется первостепенной задачей.

В настоящее время для задач биомониторинга перспективным является применение методов измерения флуоресценции хлорофилла для выявления действия токсикантов на водоросли [1, 2, 3, 4]. Основой флуоресцентных методов является то, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей. Достижения в изучении механизмов первичных процессов фотосинтеза выявили связь показателей флуоресценции хлорофилла с характеристиками состояния фотосинтетического аппарата фотосинтезирующих организмов [5, 6].

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 за счет рассеяния в тепло. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтез возбуждающем свете (F_m) и условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_o), позволяет определить эффективность первичных процессов фотосинтеза, которая равна $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$. Эффективность первичных процессов фотосинтеза (F_v/F_m) представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма [7]. Интенсивность флуоресценции F_o с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию светособирающих пигментов фотосинтетического аппарата фитопланктона, и, соответственно, коррелирует с обилием клеток микроводорослей [8, 9].

Целью данной работы является выявление токсического эффекта наночастиц серебра и золота на клетки дикого и мутантных штаммов микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii*.

Материалы и методы

В работе использовались штамм дикого типа СС-124 и мутантные штаммы (устойчивый к эритромицину СС-79 и к норфлуразону Nfr -4) зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби. Подсчет клеток в суспензии осуществляли под микроскопом в камере Горяева. Культивирование водорослей

осуществляли в фотогетеротрофных условиях при температуре 25-280 С [10]. В работе исследованы препарат наносеребра [Ag] (средний радиус 40 нм), препарат коллоидного золота [Au] (средний радиус 25 нм). 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 относительный выход переменной флуоресценции (F_v/F_m) у водорослей, который является мерой потенциальной квантовой эффективности фотосистемы 2 (ФС 2).

Результаты и обсуждение

В результате измерения обилия микроводорослей по F_0 и состояния его фотосинтетического аппарата по F_v/F_m клеток *C. reinhardtii* в контроле и после добавления наночастиц серебра. В таблице - 1 представлены результаты измерения обилия микроводорослей по F_0 и состояния его фотосинтетического аппарата по F_v/F_m клеток *C. reinhardtii* в контроле и после добавления наночастиц серебра и золота (суточная инкубации). Видно, что наночастицы серебра у клеток дикого типа *C. reinhardtii* ингибируют как количество клеток, так и фотосинтетическую активность F_v/F_m . Мутантный штамм устойчивый к эритромицину СС-79 более чувствителен к действию наночастицы серебра. Подобные данные были получены и по действию повивалгола (медпрепарата, содержащего коллоидное серебро) на максимальный квантовый выход ФС 2 - F_v/F_m .

Наночастицы золота увеличивали у клеток дикого типа F_0 по сравнению с контролем. Однако у мутантов наблюдалось ингибирование F_0 , особенно у мутанта устойчивый к норфлуразону Nfr -4). Мутант СС- 79 оказался более чувствителен к действию наночастиц золота по фотосинтетической активности F_v/F_m . Эти данные показывают, что мутанты водорослей *C. reinhardtii* могут иметь разную чувствительность к токсикологическому действию наноматериалов.

Видно, что наночастицы серебра у клеток дикого типа *C. reinhardtii* ингибируют как количество клеток, так и фотосинтетическую активность F_v/F_m . Мутант СС-79 более чувствителен к действию наночастицы серебра. Подобные данные были получены и по действию повивалгола (медпрепарата, содержащего коллоидное серебро) на максимальный квантовый выход ФС 2 - F_v/F_m . Эти данные показывают, что мутанты микроводорослей *C. reinhardtii* могут иметь разную чувствительность к токсикологическому действию наноматериалов.

Таблица-1 Изменения параметров флуоресценции клеток *C. reinhardtii* в контроле и после добавления наночастиц серебра и золота (суточная инкубации)

Объекты	Наночастицы серебра, 5×10^{-6} М		Наночастицы золота, 10^{-5} М	
	F_0 ,% от контроля	F_v/F_m ,% от контроля	F_0 ,% от контроля	F_v/F_m , % от контроля
СС-124	37	22	156	100
СС- 79	46	0	92	88
Nfr -4	30	15	62	103

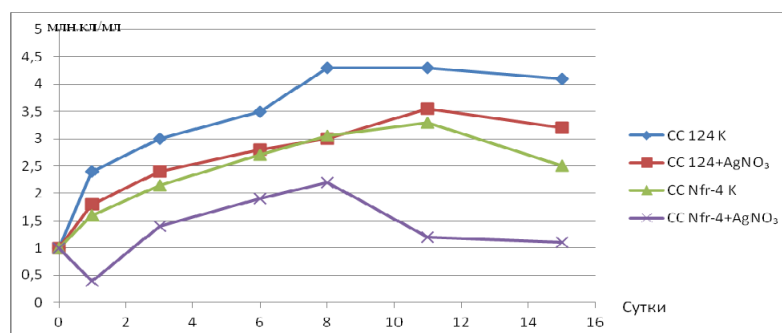


Рисунок 1- Влияние наночастицы серебра на рост клеток дикого типа и мутантных штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*

Как видно из рисунка 1 в первые сутки инкубирования увеличивается рост клеток от 1 до 3,5 млн во всех культурах микроводорослей, кроме культуры мутантного штамма Nfr-4, обработанного наночастицами серебра. На вторые, третьи сутки наблюдается прирост биомассы до 4 млн кл/мл в контроле и до 2 млн кл/мл в культурах Nfr-4 и СС 124+Ag NO₃. В варианте Nfr-4+AgNO₃ к данному времени культивирования прирост биомассы составляет 1,5 млн кл/мл. Максимальный рост клеток 4, 4 млн кл/мл в культуре СС 124, взятом за контроль наблюдается на 8 сутки, а затем наблюдается

постепенное снижение роста до 4 млн кл/мл на 15 сутки. Прирост культур СС 124+AgNO₃, Nfr-4 К на 8 сутки составляет 3 млн кл/мл, в варианте мутантная культура Nfr-4 +AgNO₃ этот показатель равен 2 млн кл/мл. На 11 сутки эксперимента наблюдалось снижение роста в вариантах с мутантным штаммом, в то время как клетки дикого штамма СС 124 в варианте с добавлением AgNO₃ продолжали расти до 3,5 млн. В последующие сутки инкубирования наблюдался рост у мутантных штаммов как обработанных серебром, так и необработанных, исключением является дикий штамм СС 124+AgNO₃, его рост снижается до 3 млн.

Таким образом, рост клеток мутантного штамма *C. reinhardtii* при добавлении наночастиц серебра был сравнительно ниже в отличие от штамма дикого типа. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что мутанты зеленой микроводоросли *Chl. reinhardtii* в сравнении с дикими штаммами более чувствительны к токсикологическому действию наноматериалов.

Показано, что наночастицы серебра могут снижать скорость развития культуры микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* и существенно изменять параметры флуоресценции хлорофилла, отражающие первичные процессы запасаения световой энергии в фотосинтезе. Наблюдалось снижение квантового выхода фотохимического превращения световой энергии в фотосинтезе. У мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* наблюдаются различия в чувствительности к наночастицам.

Таким образом, согласно полученным результатам клетки штамма дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 более устойчивы к присутствию наноматериалов по сравнению с клетками мутантных штаммов СС-79 и Nfr -4.

Это означает, что при комплексной оценке действия наноматериалов на состояние живых организмов можно использовать в качестве модельных объектов штамм дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 и мутантные штаммы СС-79 и Nfr -4.

Подводя итог можно предположить, что биотестирование с помощью микроводорослей может иметь практическую ценность для выявления как органических, так и неорганических загрязнителей. При этом использование высокочувствительных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* в оценке токсикологических действий современных наноматериалов является перспективным направлением системы биотестирования.

1. 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.
2. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Смуров А.В. Оценка качества среды инструментальными методами с использованием фототрофных организмов. В учебном пособии. Биологический контроль окружающей среды. Биондикация и биотестирование. Под ред. Мелехова О.П., Егорова Е.И. - М.: Изд. Академия, 2007. - С. 243-246.
3. Brack W., Frank H. Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus // Ecotoxicology and Environmental Safety. - 1998. - Vol.40. - №1-2. - P.34-41.
4. Schreiber U., Muller J., Haugg A., Gademann R. New type dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotest // Photosynth. Res. - 2002. - V. 74. - P. 317-330.
5. Antal T. K., Matorin D. N., Ilyash L. V., Volgusheva A. A., Osipov V. A., Konyuhov I. V., Krendeleva T. E., Rubin A. B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // Photosynthesis Research. - 2009, -V.102. -P. 67-76
6. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // Oceanologia. - 2004.- V.46. -№4. - P.519-531.
7. Krause G.H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. - 1991. - V.42. - P. 313-349.
8. Маторин Д.Н. Использование флуоресцентных методов измерения активности фотосистемы II при биомониторинге фитопланктона // Биофизика. - 2000. - Т.45/3. - С. 491-494.
9. Ostrowska M., Majchrowski R., Matorin D. N., Woźniak B. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 1. Theory of classical 'in situ' chlorophyll fluorometry // Oceanologia. – 2000. - V.42(2). - P. 203-219.
10. Заядан Б.К., Экобиотехнология фототрофных микроорганизмов // Монография. –Алматы: «Арыс», 2011 г. – 380 с.

Қазіргі заман наноматериалдарының улы әсерлерін бағалауға жоғарғы сезімтал *Chlamydomonas reinhardtii* мутант штамдарын пайдаланудың келешегіне мол деп қорытынды жасауға болады.

We conclude that the use of highly sensitive mutants of *C. reinhardtii* may be promising for the assessment of the toxic effects of modern nanomaterials.