

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Маторин Д.Н.<sup>1</sup>, Яковлева О.В.<sup>1</sup>, Тодоренко Д.А.<sup>1</sup>, Горячев С.Н.<sup>1</sup>, Алексеев А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет, биологический факультет  
ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119991, РФ

<sup>2</sup>Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова,  
ул. Беллинского, 58, г. Якутск, 677027, Республика Саха (Якутия), РФ; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0525

**Аннотация.** Рассмотрена природа замедленной флуоресценции хлорофилла (ЗФ) в водорослях, которая возникает уже после прекращения освещения за счет энергии, выделяемой в ходе обратных реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в реакционном центре фотосистемы 2. Показана перспективность использования этой флуоресценции у водорослей для биотестирования загрязнений. К достоинствам использования ЗФ для экспресс-оценки токсичности вод и в особенности питьевой воды является короткая продолжительность испытаний и, соответственно, минимизация негативного влияния изменения физико-химических свойств среды на результаты, использование малых количеств тест-объектов. Преимущество ЗФ также в том, что измеряются только живые клетки с активными реакционными центрами фотосинтеза, что увеличивает чувствительность тестов на токсичность. Этот метод несет дополнительную информацию о важнейшем процессе в клетке – энергизации фотосинтетических мембран и связанным с этим образованием АТФ.

**Ключевые слова:** замедленная флуоресценция, фотосинтез, биотестирование, микроводоросли.

Важным источником информации о характере функционирования фотосинтетического аппарата является процесс замедленной флуоресценции (ЗФ) или длительного послесвечения, обнаруженный Стреллером и Арноном в 1951 г. [1]. Явление замедленной флуоресценции состоит в том, что после светового возбуждения в фотосинтезирующих клетках наблюдается слабое длительно затухающее красное свечение, испускаемое хлорофиллом *a*. Это свечение возникает уже после прекращения флуоресценции за счет энергии, выделяемой в ходе темновых реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в реакционном центре (РЦ) фотосистемы 2 (ФС 2). Различие между быстрой и замедленной флуоресценцией связано с природой возбуждения излучающей молекулы хлорофилла. Быстрая флуоресценция связана с процессами дезактивации возбуждения хлорофилла перед разделением зарядов в реакционном центре, тогда как ЗФ возникает после первичного акта фотосинтеза, и энергия появляется в результате обратной рекомбинации разделенных зарядов. В процессе быстрой флуоресценции излучается 2-3 % поглощенной энергии, тогда как выход ЗФ составляет только 0,03 % и менее от испускаемой флуоресценции.

Природа и свойства разных компонент рассмотрены в многочисленных обзорах [2-8]. В реакционном центре фотосистемы 2 после поглощения кванта света может образовываться целый ряд состояний, связанных с обратимой стабилизацией энергии при переносе электрона от РЦ на вторичные акцепторы, а также при переносе положительного заряда ко вторичным донорам. Обратная рекомбинация между продуктами в разном состоянии приводит к излучению ЗФ со временами затухания, соответствующим временам жизни данного состояния. Подробный анализ связи появления отдельных компонент ЗФ с состояниями РЦ ФС 2 содержится в работах [2,3,5]. Изучение кинетики затухания ЗФ позволяет изучать последовательность процессов стабилизации энергии возбуждения в ФС 2.

Генерация ЗФ зависит не только от состояния акцепторной части ФС2, но от окисленных переносчиков на донорной стороне ФС2. Для многих компонент ЗФ показана связь с накоплением положительных зарядов в кислород-выделяющем комплексе (КВК) – так называемых состояний  $S_1 \rightarrow S_4$  [2,8,9]. Функционирование КВК успешно изучают по кинетике выделения  $O_2$  на одиночные световые вспышки (1-10 мкс). При освещении водорослей или листьев серией коротких вспышек наблюдается осцилляция интенсивности ЗФ с периодом 4, которые отражают состояния в кислородовыделяющей системе.

Показана связь выхода ЗФ с энергизацией тилакоидных мембран, обусловленной появлением разности значений рН и электрических потенциалов на мембране [10]. Создание разности рН на мембране увеличивает скорость реакции рекомбинации, обуславливающей появление ЗФ. Связь выхода ЗФ с энергизацией мембран была подтверждена экспериментами, показывающими возрастание интенсивности ЗФ при добавлении кофакторов, ускоряющих транспорт электрона и сопряженное с ним образование разности электрохимических потенциалов ионов водорода на тилакоидной мембране, а также подавление этого возрастания разобщителями [4].

Влияние трансмембранного электрического поля на выход ЗФ было подробно изучено в экспериментах со стимуляцией ЗФ при добавлении к хлоропластам солей [10], а также при наложении внешнего электрического поля [11].

В последнее время после периода относительного покоя в исследованиях ЗФ вновь началось активное изучение индукционных кривых ЗФ в миллисекундном интервале времени, что связано с выпуском новейших

приборов для регистрации ЗФ (HansaTech, Англия) [3]. Этот прибор позволяет проводить одновременную регистрацию индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также регистрировать поглощение при длине 820 нм в отраженном модулированном свете, отражающее изменения  $P_{700}$ . На этом приборе в последнее время проведен цикл работ по исследованию индукционных кривых ЗФ [3,12-15].

Для решения задач мониторинга водной среды необходимы методы, позволяющие проводить диагностику на ранних стадиях антропогенных воздействий до появления видимых нарушений экосистемы. Биотестирование, как метод водной токсикологии обычно используется для регламентирования токсического загрязнения водной среды или выработки норм допустимых нагрузок на водные экосистемы. Водоросли лежат в основе водных экосистем и поэтому могут быть использованы в качестве биоиндикаторов водных сред. Преимуществом использования в биотестировании фотосинтетиков является высокая чувствительность к загрязнителям. В современной практике широко используются стандартизированные методы биотестирования на пресноводных зеленых микроводорослях рода *Chlorella* и *Scenedesmus*, культивируемых по общепринятой методике. Основными показателями токсического действия служат рост и выживаемость культуры в опытах по сравнению с контролем в ходе длительного культивирования. Между тем экспресс-оценка токсичности вод и в особенности питьевой воды по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции, в том числе и ЗФ, является чрезвычайно актуальна [5]. К достоинствам относятся короткая продолжительность испытаний и, соответственно, минимизация негативного влияния изменения физико-химических свойств среды на результаты, использование малых количеств тест-объектов. Преимущество ЗФ также в том, что измеряются только живые клетки, что увеличивает чувствительность тестов на токсичность. Подсчет клеток под микроскопом или спектроскопические измерения хлорофилла включает также клетки, погибшие из-за токсинов. Это часто занижает токсические эффекты.

Преимущества использования ЗФ связаны с тем, что она несет дополнительную информацию о важнейшем процессе в клетке – энергизации фотосинтетических мембран и связанным с этим образованием АТФ. Показано, что многие токсические вещества в первую очередь влияют на эти энергопреобразующие процессы в клетке. Кроме того, оценка токсичности с измерением ЗФ по сравнению с методами быстрой флуоресценции исключает проблемы с флуоресценцией фона, которая может быть существенной, например, в стоках сточных вод.

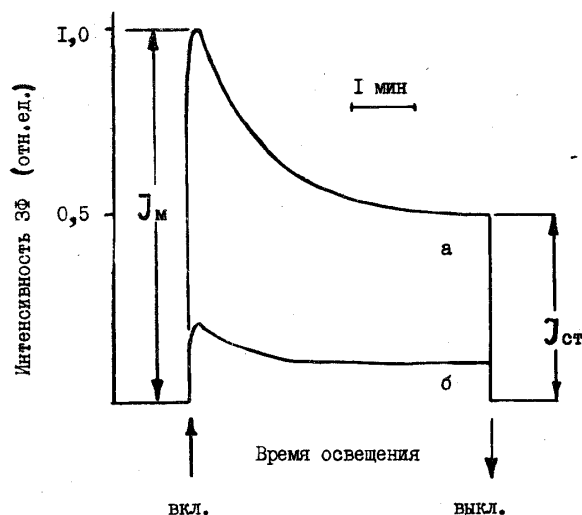
Нами были отработаны научно-методологические подходы по использованию ЗФ в биотестировании различных загрязнений [4,5]. Как флуоресцентный метод, ЗФ также характеризуется быстротой (2 мин), низкой трудоемкостью процесса измерения и высокой чувствительностью к действию токсикантов. Регистрация на свету первичных изменений фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительного к повреждающим воздействиям, позволяет сократить время инкубации до 3 часов, по сравнению с 1–10 сутками при оценке токсичности по снижению скорости роста.

Проведенные нами многочисленные токсикологические эксперименты с тяжелыми металлами, гербицидами, полиароматическими углеводородами (ПАУ), ПАВ, органическими пестицидами и др. показали, что снижение относительного выхода ЗФ и отношения индукционного максимума к стационарному значению являются одной из первичных неспецифических реакций водорослей на воздействие токсикантов. При использовании интенсивной культуры хлореллы присутствие в среде веществ в токсических концентрациях, способных привести к гибели водорослей, достоверно обнаруживается по ЗФ уже в первые 3-4 часа эксперимента, что может быть использовано для экспрессной оценки степени токсичности и пределов токсических концентраций различных загрязнителей.

Для определения наличия токсического вещества в анализируемых пробах предпочтительно использовать наиболее интенсивные миллисекундные компоненты ЗФ микроводорослей (тест-объект) [5]. Загрязнения, неблагоприятно влияющие на водоросли и растения и, соответственно, угнетающие фотосинтез, изменяют параметры ЗФ и ингибируют интенсивность ЗФ. При тестировании измеряется индукционная кривая ЗФ замедленной флуоресценции после включения света. Интенсивность свечения после включения света возрастает до максимума ( $I_m$ ) с последующим уменьшением к стационарному уровню ( $I_{ст}$ ) (рис. 1). Присутствие токсиканта (гербицид-прометрин) приводит к уменьшению амплитуды индукционного максимума и уменьшению отношения амплитуды свечения в индукционном максимуме к стационарному уровню. Сильнодействующие агенты могут вызывать ингибирование всего свечения по всей индукционной кривой. Изменения этих параметров ЗФ по сравнению с контрольным вариантом без токсиканта более чем на 25% свидетельствует о фитотоксическом действии исследуемого вещества или наличии фитотоксического агента в сточной воде.

Наиболее чувствительны водоросли были к действию солей тяжелых металлов, гербицидов, оловоорганических соединений. Как показали результаты пробит-анализа, токсичность веществ указанных групп для водорослей возрастала в следующей последовательности: цинк < свинец < медь < ТПОХ < кадмий < хром < DCMU < ртуть. Экспериментально установленные максимальные концентрации веществ, не оказывавшие достоверного действия как на интенсивную культуру хлореллы (по ЗФ) в суточных опытах, так и на стандартную культуру хлореллы в хронических опытах продолжительностью 10-25 суток, показали близкое соответствие результатов.

В литературе с использованием миллисекундной ЗФ также продемонстрированы ранние эффекты токсического действия цинка, кобальта, кадмия, связанные со снижением энергизации тилакоидных мембран клеток водоросли [12-15]. Существует работы по использованию разных параметров ЗФ для оценки действия на водоросли различных токсикантов и гербицидов [16,17]. При исследовании действия различных фенолов на



**Рисунок 1.** Влияние гербицида прометрина на индукционную кривую замедленной флуоресценции клеток хлореллы: а – контроль, б – в присутствии  $10^{-7}$ М прометрина. Стрелками вверх и вниз обозначены моменты включения и выключения света, соответственно.

фотосинтетическую активность водоросли *Chlorella pyrenoidosa* также показано преимущество метода ЗФ, связанное с более ранним выявлением токсического воздействия по сравнению с параметрами быстрой флуоресценции [13]. Современные приборы (например, М-РЕА-2) позволяют проводить наряду с ЗФ одновременную регистрацию индукции быстрой флуоресценции и изменения активности ФС1 по  $P_{700}$ . Это позволяет получить информацию о конкретных местах воздействий токсиканта на реакции фотосинтеза.

Показано, что замедленную флуоресценцию можно использовать в стандартном биотесте на токсичность. Метод миллисекундной ЗФ введен в сертифицированную методику по определению острой токсичности различных вод и отходов [18]. Методика основана на измерении изменений относительного показателя ЗФ хлорофилла тест-культуры хлореллы. Применимость измерения долгоживущих компонент послесвечения ЗФ со временем затухания 0,2 секунды и дольше для биотестирования на токсичность была продемонстрирована в работе [6].

Полученные результаты токсикологических исследований указывают на возможность использования характеристик замедленной флуоресценции в интенсивной культуре микроводорослей для экспрессного обнаружения в водной среде фитотоксических веществ в концентрациях, токсичность которых подтверждается хроническими опытами на аналогичных тест-объектах по стандартной методике.

*Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды», российского научного фонда (проект № 20-64-46018) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00465).*

**Список литературы / References:**

1. Strehler B.L., Arnold W. Light production by green plants. *J. Gen. Phys.*, 1951, vol. 34, pp. 809-820.
2. Govindjee Jursinic P.A. Photosynthesis and fast changes in light emission by green plants. In *Photochemical and Photobiological Reviews*. (Edited by K. C. Smith). *Plenum Press.*, New York, 1979, vol. 4, pp. 125-205.
3. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J., Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, 2009, vol. 101, pp. 217-232.
4. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. Замедленная флуоресценция и ее использование для оценки состояния растительного организма. *Изд. АН СССР. Сер. биол.*, 1985, № 4, с. 508-520. [Matorin D.N., Venediktov P.S. Rubin A.B. Delayed fluorescence and its use to assess the state of the plant organism. *Izd. AN SSSR, ser. biol.*, 1985, no. 4, pp. 508-520. (In Russ.)]
5. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. *Замедленная флуоресценция растений и водорослей. Теоретические и практические аспекты.* М.: Изд-во Альтрекс, 2011, 202 с. [Matorin D.N., Osipov V.A., Venediktov P.S., Rubin A.B. *Delayed fluorescence of plants and algae. Theoretical and practical aspects.* М.: Izd-vo Al'treks, 2011, 202 p. (In Russ.)]
6. Berden-Zrimec M., Drinovec L., Zrimec A.M., Suggett D.J. et al. Delayed Fluorescence. Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. *Developments in applied/Phycology 4, Springer Science*, 2011, pp. 293-309.
7. Krasnovsky A.A. Delayed fluorescence and phosphorescence of plant pigments. *Photochem. Photobiol.*, 1982, vol. 36, pp. 773-774.
8. Маторин Д.Н., Яковлева О.В. *Фотолюминесценция растений.* М.: Изд-во Альтрекс, 2019, 256 с. [Matorin D.N., Yakovleva O.V. *Plant photoluminescence.* М. Izd-vo Al'treks, 2019, 256 p. (In Russ.)]

9. Goltsev V.N., Ortoizze T.V., Sokolov J.N., Matorin D.N., Venediktov P.S. Delayed luminescence yield kinetics in flash illuminated green plants. *Plant Sci. Lett.*, 1980, vol. 19, pp. 339-346.
10. Crofts A.R., Wright C.A., Fleischmann D.E. Energy conservation in the photochemical reactions of photosynthesis and its relation to delayed fluorescence. *FEBS Lett.*, 1971, vol. 15, no. 1, pp. 89-100.
11. Ortoizze T.V., Borisevitch G.P., Venediktov P.S., Kononenko A.A., Matorin D.N., Rubin A.B. Electric field stimulation of the delayed fluorescence in dry films of chloroplasts and subchloroplast particles enriched in PS2. *Biochim. Physiol. Pflanzen*, 1979, vol. 174, no. 1, pp. 85-91.
12. Matorin D.N., Todorenko D.A., Seifullina N.Kh., Zayadan B.K., Rubin A.B. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology*, 2013, vol. 82, no. 6, pp. 862-867.
13. Matorin D.N., Plekhanov S.E., Bratkovskaia L.B., Iakovleva O.V., Alekseev A.A. The effect of phenols on the parameters of chlorophyll fluorescence and reaction of P700 in the green algae *Scenedesmus quadricauda*. *Biofizika*, 2014, vol. 59, no. 3, pp. 458-465.
14. Gabbasova D.T., Matorin D.N., Konyukhov I.V., Seifullina N.Kh., Zayadan B.K. Effect of chromate ions on marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbiology*, 2017, vol. 86, no. 1, pp. 54-62.
15. Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Matorin D.N., Akmukhanova N.R., Kokocinski M., Timofeev N.P., Balouch Kh., Bauenova M.O. Effect of Cadmium Ions on Some Biophysical Parameters and Ultrastructure of *Ankistrodesmus* sp. B-11 Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2020, vol. 67, no. 5, pp. 845-854.
16. Vasil'ev I.R., Matorin D.N., Lyadsky V.V., Venediktov P.S. Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence. *Photosynth. Res.*, 1988, vol. 15, no. 1, pp. 33-39.
17. Dahse J., Matorin D.N., Liebermann B. A comparison of tentoxin action on the delayed fluorescence chloroplasts of Spinach, *Chlorella* and *Anasystis*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1986, vol. 181, pp. 137-146.
18. Григорьев Ю.С., Стравинскене Е.С. Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*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, 37 с. [Grigoriev Yu.S., Stravinskene E.S. Method for measuring the relative indicator of delayed fluorescence of a *Chlorella vulgaris* Beijer) culture for determining the toxicity of drinking, fresh natural and waste waters, water extracts from soils, soils, sewage sludge, production and consumption waste. PND F T 14.1:2.4.16-09 PND F T 16.1:2.3:3.14-09, 2014, 37 p. (In Russ.)]

#### PROSPECTS FOR USING DELAYED FLUORESCENCE OF ALGAE FOR CONTAMINATION BIOTESTING

Matorin D.N.<sup>1</sup>, Yakovleva O.V.<sup>1</sup>, Todorenko D.A.<sup>1</sup>, Goryachev S.N.<sup>1</sup>, Alekseev A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Faculty of Biology,

Leninskie Gory St. 1, p. 12, Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup>North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov,

58 Belinsky Street, Yakutsk, 677027, Republic of Sakha (Yakutia), Russia; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Received 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0525

**Abstract.** The nature of the delayed chlorophyll fluorescence (DF) in algae, which occurs already after the cessation of illumination due to the energy released during the reverse reactions of the primary photosynthesis photoproducts in the reaction center of the photosystem 2, is considered. The use of this fluorescence in algae for biotesting of contaminants is shown to be promising. The advantages of using DF for express assessment of water toxicity, especially drinking water, are short durations of tests and, accordingly, the minimized negative impact of physicochemical changes in the medium on the results, as well as the need of small amounts of test objects. The other advantage of DF is that only living cells with active photosynthetic reaction sites are measured, which increases the sensitivity of toxicity tests. This method provides additional information about the most important process in the cell - the energization of photosynthetic membranes and the formation of ATP associated with this.

**Key words:** photosynthesis, delayed fluorescence, biotesting, microalgae.