

А. О. Гуца, А. А. Добровольский,
А. В. Привалко, Ю. П. Федоренко, В. Н. Харкянен

РЕАКЦИОННЫЕ ЦЕНТРЫ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ И ЗЕЛЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК ДАТЧИКИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Проведены оптические и спектральные исследования зеленых растений, реакционных центров (РЦ) пурпурных бактерий, а также ленгмюровских пленок на их основе для выявления наиболее информативных в экодиагностике свойств указанных объектов. Показано, что кинетико-флуоресцентные измерения наиболее подходят для выявления гербицидов в окружающей среде. Ленгмюровские пленки на основе РЦ бактерий *Rhodobacterium sphaeroides* также представляются перспективными для использования в качестве биорегистраторов систем экологического мониторинга. Приведены результаты изучения кинетики темнового фотовосстановления поглощения пленок. Показано также, что при нахождении в водной среде с гербицидами в концентрациях до 10^{-7} М изменяется соотношение вкладов короткоживущей и долгоживущей компонент соответствующих кинетических кривых.

Введение. В настоящей работе исследована возможность применения фотосинтетических биообъектов — мембран пурпурных бактерий (*Rhodobacterium sphaeroides*) и реакционных центров (РЦ) этих бактерий, а также некоторых высших зеленых растений в качестве биосенсорных устройств в системах анализа экологического состояния окружающей среды. Интенсивные работы последних лет позволили выявить влияние широкого класса химических веществ на изменения в структуре и динамику электронного транспорта в РЦ фотосинтетических веществ. В частности, целый ряд из них посвящен изучению воздействия на РЦ фотосистем растений и фотосинтетических бактерий гербицидов — эффективных ингибиторов процесса фотосинтеза [1, 2]. Отдельно можно упомянуть сообщения, в которых описываются различные сенсорные устройства для определения содержания в экосистемах гербицидов в достаточно низких концентрациях (см., например, работы [3, 4], где исследуются пьезокристаллические и биохимические датчики).

Мы предлагаем использовать некоторые свойства фотосинтетических веществ для целей экомониторинга. В настоящей работе исследованы: 1) кинетико-флуоресцентные характеристики зеленых растений и влияние на них такого фактора экологического загрязнения среды, как гербициды (атразин); 2) некоторые спектральные и оптические свойства РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides*, выделенных из хлоропластов традиционными методами [5, 6]. Поскольку более удобным для практического применения могут быть различные пленочные структуры, мы исследовали также пленки Ленгмюра — Шефера, посаженные на стеклянную подложку, как описано ранее [7, 8]. Перенос РЦ на подложку осуществляли при давлении 250 мкН/см.

Материалы и методы. Все эксперименты проводили на установке, блок-схема которой представлена на рис. 1.

Спектры поглощения РЦ регистрировали традиционным методом, а также при дополнительной лазерной подсветке ($\lambda_r = 632,8$ нм), стимулирующей фотоокисление бактериохлорофилла.

Кинетические кривые темнового фотовосстановления поглощения (ДА) РЦ измеряли следующим образом. Выдержанные в темноте об-

© А. О. Гуца, А. А. Добровольский, А. В. Привалко, Ю. П. Федоренко, В. Н. Харкянен, 1994

разцы РЦ подвергали дополнительному импульсному возбуждению излучением лампы-вспышки ИСШ-100 ($\tau_n=10$ мкс), прошедшим через цветное стекло СЗС-22 ($\lambda_{\text{пропуск}}=400-600$ нм). Изменение сигнала поглощения на длине волны $\lambda=868$ нм фиксировали фотоприемником спустя ≈ 1 мс после действия лампы-вспышки. В отдельных случаях в качестве возбуждающего импульсного источника света использовали пучок He-Ne лазера ($\lambda_r=632,8$ нм), действующий на объект в течение времени открытия управляемого электромеханического затвора ($\tau_n \geq 0,1$ с).

Кривые индукции флюоресценции зеленых растений регистрировали на длине волны $\lambda \approx 685$ нм при возбуждении образцов излучением

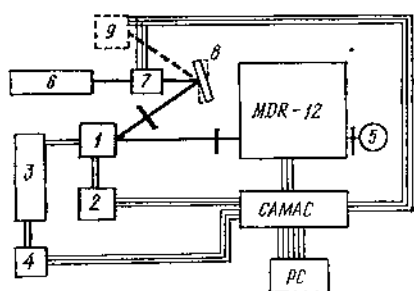


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки: 1 — кюветный модуль; 2 — блок управления температурой кюветы; 3 — ФЭУ-157; 4 — дифференциальный усилитель; 5 — лампа КГМ-24; 6 — лазер ЛГ-79-1; 7 — электромеханический прерыватель; 8 — поворотное зеркало; 9 — импульсная лампа ИСШ-100

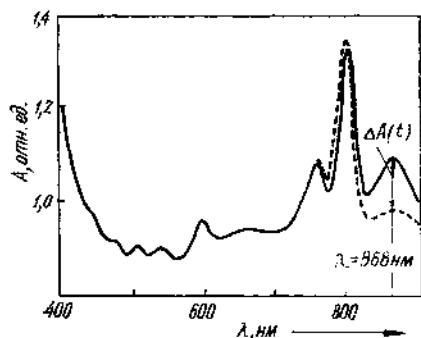


Рис. 2. Спектр поглощения РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* (сплошная линия). Изменения в спектре поглощения в области 700—900 нм связаны с фотоокислением бактериохлорофилла под действием насыщающей оптической подсветки

He-Ne лазера ($\lambda_r=632,8$ нм). Перед началом измерений образцы в течение 20 мин выдерживали в темноте, после чего за время не более 1 мс открывали затвор и записывали индукционную кривую с временным разрешением 1 мс/точку.

Все измерения проводили при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение. Остановимся вначале на анализе тех свойств объектов исследований, которые могут нести наиболее адекватную информацию о состоянии окружающей среды. Спектры поглощения РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* представлены на рис. 2. Характерная трехполосная структура спектра поглощения в области 730—880 нм соответствует поглощению света различными пигментами на основе бактериохлорофилла. Известно, что изменение характера спектра в этой спектральной области связано с фотоокислением РЦ [9] и последующим фотоконформационным переходом в РЦ [10]. Эти изменения также отчетливо проявляются в кривых кинетики темнового фотовосстановления поглощения РЦ при возбуждении их импульсами насыщающего света (рис. 3). В случае отсутствия фотоокисления пигментов РЦ пурпурных бактерий кривые характеризуются наличием как короткоживущей, так и долгоживущей компонент (рис. 3, б). При более продолжительном световом воздействии на РЦ время темнового фотовосстановления поглощения увеличивается вплоть до времен, характерных для полностью фотоокисленной системы с завершёнными изменениями ее белковых структур (рис. 3, а).

Как хорошо известно, если в среде нахождения хлоропластов или РЦ присутствуют гербициды (в частности, атразин), то они эффективно вытесняют из места связывания вторичный хиноновый акцептор Q_B , принимающий непосредственное участие в процессах разделения зарядов и электронного транспорта при фотосинтезе [1, 2, 11]. В результате такого вытеснения существенным образом меняется динамика ре-

лаксационных процессов в исследуемых объектах. Так, при возбуждении их импульсами насыщающего излучения по методике, описанной выше, в кинетических кривых регистрируется только короткоживущая компонента (рис. 3, в). Характер кривой при этом незначительно меняется в зависимости от времени и интенсивности световой адаптации объектов исследований.

Таким образом, наличие гербицидов в среде хорошо фиксируется оптически по кинетике релаксации возбуждения в РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides*. Характерные времена темнового фотовосстанов-

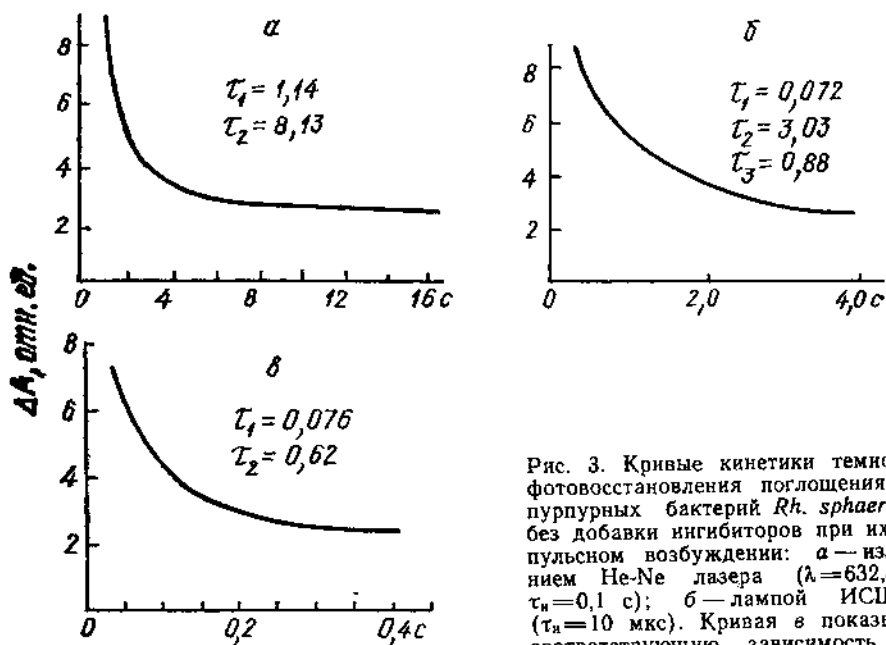


Рис. 3. Кривые кинетики темнового фотовосстановления поглощения РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* без добавки ингибиторов при их импульсном возбуждении: а — излучением He-Ne лазера ($\lambda = 632.8$ нм, $\tau_n = 0.1$ с); б — лампой ИСП-100 ($\tau_n = 10$ мкс). Кривая в показывает соответствующую зависимость для

образца, обработанного атразином (концентрация 10^{-7} М), при импульсном возбуждении лампой ИСП-100. На рисунках указаны времена наиболее оптимальной экспоненциальной аппроксимации экспериментальных кривых расчетными (в секундах)

ления поглощения образцов, обработанных атразином в концентрациях до 10^{-7} М, в несколько раз меньше, чем у необработанных образцов.

Нами изучены кривые темнового фотовосстановления поглощения пленок Ленгмюра — Шефера — 10, 20 и 30 монослоев. На рис. 4, а, приведена соответствующая кривая для образца, находившегося в чистой среде, характер которой практически полностью повторяет аналогичную зависимость для суспензий РЦ *Rh. sphaeroides* с разрешенным переносом электрона на вторичный хиноновый акцептор (см. рис. 3, а). При помещении пленок на 5 мин в водный раствор атразина с концентрацией от 10^{-5} до 10^{-7} М блокируется перенос электронов на Q_A, что отчетливо фиксируется экспериментально в виде увеличения вклада короткоживущей компоненты (рис. 4, б). По-видимому, механизм блокирования электронного транспорта в пленках такой же, как и в суспензиях РЦ, и заключается в вытеснении хиноновых молекул из мест связывания в макромолекулах.

Отметим, что полученные нами пленки Ленгмюра — Шефера сохраняли свои свойства в течение двух месяцев, что является неплохим показателем для практического применения. Увеличение информативности сигналов от пленок может быть достигнуто при их получении методом электроосаждения на свету. При этом увеличивается степень ориентации пленок и значительно улучшается их качество. Такие исследования представляют собой задачу ближайшего будущего.

Подобно РЦ пурпурных бактерий достаточно адекватную реакцию на присутствие в среде гербицидов дают фотосинтетические системы

высших зеленых растений. Как известно, фотосистема II зеленых имеет структуру РЦ, сходную с таковой пурпурных бактерий [1, 12], что дает основание ожидать значительное влияние гербицидов на транспорт электронов в РЦ зеленых и на проявление подобного влияния в характерных оптических свойствах исследуемых образцов.

Нами изучались кривые индукции флуоресценции некоторых растений и действие на них гербицидов, находящихся в среде обитания растений. В опытах использовали листья растений кукурузы, свеклы и редьки. Регистрировали кривые как быстрой, так и медленной ин-

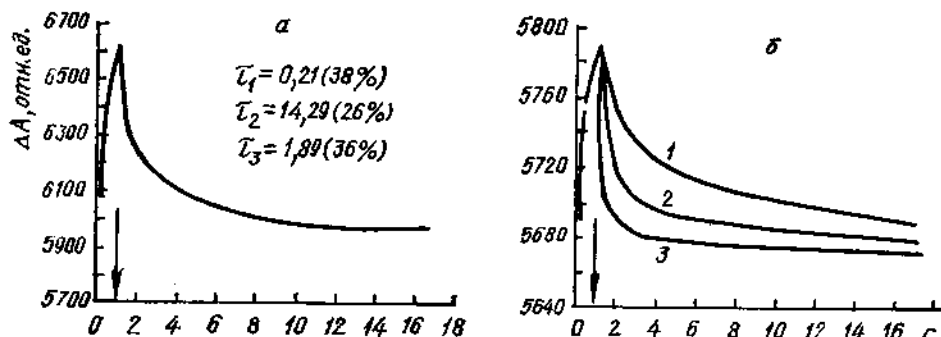
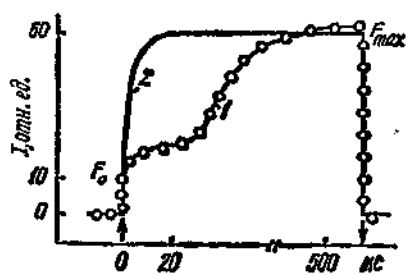


Рис. 4. Кривые кинетики темнового фотовосстановления поглощения денгмюрловских пленок РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* (20 монослоев) до (а) и после (б) обработки раствором атразина в течение 5 мин (стрелками указаны моменты выключения возбуждающего излучения; длительность возбуждающего импульса 1 с): а — времена оптимальной экспоненциальной аппроксимации экспериментальных кривых расчетными (с) и соответствующие весовые множители (%); б — образцы, обработанный атразином в концентрации 10^{-7} М (1), оптимальная аппроксимация: $\tau_1=0,21$ (50%), $\tau_2=13,0$ (20%), $\tau_3=1,89$ (30%); 10^{-6} М (2), $\tau_1=0,21$ (70%), $\tau_2=12,0$ (20%), $\tau_3=1,89$ (10%); 10^{-5} М (3), $\tau_1=0,21$ (88%), $\tau_2=11,11$ (12%)

Рис. 5. Кривые индукции флуоресценции зеленых листьев растений: 1 — для растений, находящихся в чистой среде; 2 — для растений, находящихся в среде, обработанной атразином на уровне ПДК. Стрелками указаны моменты включения (↑) и выключения (↓) действующего излучения



дукции флуоресценции растений. Результаты записи кривых индукции флуоресценции растений, содержащихся в чистой среде и в среде с добавлением атразина (10^{-5} М), показаны на рис. 5. Изменение значений характеристических точек кривых (величины F_0 , F_m и др.) однозначно свидетельствует о влиянии атразина на блокирование канала переноса электронов через электронно-транспортную цепь фотосистемы II растений. Это дает возможность рассматривать методику измерения кривых быстрой индукции флуоресценции растений как пригодную для целей экодиагностики.

На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы.

1. Кривые индукции флуоресценции высших растений являются очень чувствительным индикатором присутствия атразина в окружающей среде. Можно ожидать, что при наличии в среде обитания растений других гербицидов они также могут быть зафиксированы на уровне предельно допустимых концентраций. Это дает основание рассматривать указанный метод как очень удобный для использования в системах экомониторинга.

2. РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* дают хорошие результаты в диагностике наличия гербицидов в среде при анализе времен

релаксации объектов после их возбуждения импульсами насыщающего излучения.

3. Ленгмюровские пленки на основе РЦ пурпурных бактерий представляются особо перспективным материалом для целей экодиагностики, поскольку чрезвычайно удобны в работе и дают простую и адекватную реакцию на воздействие гербицидов в концентрациях до 10^{-7} М.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении экспериментов А. А. Кононенко, Е. П. Лукашову и П. П. Ноксу.

В заключение отметим, что работа частично финансировалась из Фонда фундаментальных исследований Украины.

О. О. Гуца, О. А. Добровольский,
А. В. Привалко, Ю. П. Федоренко, В. М. Харкянен

РЕАКЦИОННИ ЦЕНТРИ ПУРПУРОВИХ БАКТЕРИЙ ТА ЗЕЛЕНІ РОСЛИНИ ЯК ДАТЧИКИ ЕКОЛОГІЧНОГО СТАНУ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Резюме

Досліджено спектри поглинання та кінетика фотовідновлення поглинання при додатковому імпульсному збудженні реакційних центрів (РЦ) пурпурових бактерій *Rhodobacterium sphaeroides* та ленгмюрівських плівок, виготовлених із цих РЦ, у вигляді чистих препаратів і з додавкою інгібітора (атразину), що блокує перенос електрона по електрон-транспортному ланцюгу РЦ. Показано, що добавка атразину в концентраціях 10^{-7} М суттєво змінює оптико-кінетичні властивості РЦ бактерій. Вплив атразину на властивості ленгмюрівських плівок проявляється у значному збільшенні частки короткоживучих компонентів у залежностях релаксації їх поглинання при імпульсному оптичному збудженні. Вивчено також вплив інгібіторів на кінетико-флюоресцентні властивості зелених рослин, крива індукції флюоресценції яких може відігравати роль чутливого індикатора наявності забруднювачів у середовищі перебування рослин.

A. O. Gushcha, A. A. Dobrovolsky, A. V. Privalko, Yu. P. Fedorenko, V. N. Kharkyanen

GREEN PLANTS AND REACTION CENTERS OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA AS SENSORS OF ECOLOGICAL STATE OF ENVIRONMENT

Summary

The green plants, reaction centers (RC) of purple bacteria and Langmuir films on their base were studied by optical and spectroscopic methods. The present communication was to discover the most informative properties of these objects for the ecological diagnostic. It was shown that kinetics fluorescent measurements were the most suitable for finding out of herbicides in the environment. Langmuir films on RC bacteria *Rh. sphaeroides* base seemed to be very promising for use as bioregistration system for ecological monitoring due to their adequate on environment pollution and convenient in operating.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sinning I. Herbicide binding in the bacterial photosynthetic reaction center // Trends Biochem. Sci.—1992.—17.—P. 150—154.
2. Draber W., Tietjen K., Kluth J., Trabst A. Herbicides in photosynthesis research // Angewandte Chemie.—1991.—30, N 12.—P. 1621—1633.
3. Colapicchioni C., Barbaro A., Porcelli F., Giannini J. Immunoenzymatic assay using chemif devices // Sensors and Actuators B.—1991.—4.—P. 245—250.
4. Ngen-Ngwainbi I., Foley P. H., Knan S., Guilbault G. G. Parathion antibodies on piezoelectric crystals // J. Amer. Chem. Soc.—1986.—108.—P. 5444—5447.
5. Нокс П. П., Адамова Н. П., Пащенко В. З. и др. Выделение и исследование фотохимических свойств фотосинтетических реакционных центров из клеток *Rh. sphaeroides*, штамм [760-1] // Молекуляр. биология.—1976.—10.—С. 641—651.
6. Захарова Н. И., Фабиан М. И., Успенская Н. Я. и др. Структурно-функциональные характеристики фотосинтетических реакционных центров, выделенных с

- лауридиметиламинооксидом из *Phodopseudomonas sphaeroides* (дикий тип) // Биохимия.—1981.—46.—С. 1703—1711.
7. Zaitsev S. Yu., Lukashov E. P., Kononenko A. A. et al. Monolayers of photosynthetic reaction centers of green and purple bacteria // Thin Solid Films.—1992.—210/211.—P. 723—725.
 8. Ерохин В. В., Каюшина Р. Л., Львов Ю. М. и др. Получение ленгмюровских пленок фотосинтетических реакционных центров пурпурных бактерий // Докл. АН СССР.—1988.—299.—С. 1262—1266.
 9. Рубин А. Б. Биофизика.—М.: Высш. шк.—1987.—Т. 2.—С. 209.
 10. Шайтан К. В., Упоров И. В., Лукашев Е. П. и др. Фотоконформационный переход—причина температурных и световых эффектов при рекомбинации зарядов в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий // Молекуляр. биология.—1991.—25.—С. 695—705.
 11. Parson W. W. Quinones as secondary electron acceptor // The photosynthetic bacteria.—New York; London: Plenum press, 1978.—P. 455—469.
 12. Кочубей С. М. Мембранные белки хлоропластов. Супрамолекулярный комплекс ФО2 // Физиология и биохимия культурных растений.—1992.—24.—С. 315—324.

Межотрасл. науч.-инж. центр по физике живого
и микроволн. резонанс. терапии «Відгук», Киев

Получено 02.08.93