

**Jacek Sikora*, Jakub Żurawski*, Joanna Rutkowska*,
Barbara Poniedziałek*, Krzysztof Wiktorowicz*, Alina Dudkowiak****

**WPŁYW METALI CIĘŻKICH NA FLUORESCENCJĘ CHLOROFILU
SYNECHOCYSTIS AQUATILIS**

**INFLUENCE OF HEAVY METALS ON SYNECHOCYSTIS AQUATILIS
CHLOROPHYLL FLUORESCENCE**

Słowa kluczowe: metale ciężkie, sinice, cytometria przepływową.

Key words: heavy metals, cyanobacteria, flow cytometry.

*The objective of the investigation was to examine the effect of various concentrations of heavy metals on fluorescence of *Synechocystis aquatilis* cyanobacterium by flow cytometry. Cyanobacteria were cultured for 6 and 24 hours in medium containing solutions of salts of silver, cadmium, copper, mercury, lead and zinc. In the experiment, an increase of chlorophyll fluorescence following a six-hour exposure to low concentrations of metals was observed. A twenty-four-hour exposure to metals caused fluorescence quenching in cells cultured in media containing AgNO_3 and HgCl_2 , and an increase or decrease of fluorescence emission in the case of CdCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ and ZnCl_2 . Flow cytometry proves to be a fast and reliable method for the assessment of influence of heavy metal pollution in aquatic environment on biological activity of photosynthetic organisms.*

1. WPROWADZENIE

Metale ciężkie w środowisku wodnym stanowią zagrożenie dla życia biologicznego zasiedlającego to środowisko i dla człowieka, korzystającego z jego zasobów. Proces bioakumulacji metali ciężkich w organizmach na zachodzący na kolejnych etapach łańcucha po-

* *Mgr Jacek Sikora, dr n. biol. Jakub Żurawski, mgr Joanna Rutkowska, dr n. med. Barbara Poniedziałek, prof. dr hab. n. med. Krzysztof Wiktorowicz – Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań; tel.: 61 853 05 71; e-mail: wnozbiol@ump.edu.pl*

** *Dr hab. Alina Dudkowiak – Instytut Fizyki Politechniki Poznańskiej, ul. Nieszawska 13A, 60-965 Poznań; tel.: 61 665 31 17; e-mail: office_phys@put.poznan.pl*

karmowego stanowi szczególne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Metale ciężkie wśród wielu szkodliwych efektów mogą wykazywać działanie teratogenne, wpływać niekorzystnie na płodność i prowadzić do upośledzenia odporności [Mendola i in. 2008; Rier 2008; Windham 2008].

W środowisku wodnym wzrost stężenia metali może następować w wyniku naturalnych procesów wypłukiwania z gleby i skał. Nie osiąga on wtedy jednak zwykle poziomów mogących zagrozić człowiekowi. Przyczyną znacznego wzrostu poziomu metali ciężkich w środowisku wodnym jest działalność rolnicza i przemysłowa [Zhou i in. 2008]. Skala problemu skażenia środowiska metalami ciężkimi skłania do poszukiwania skutecznych i miarodajnych sposobów monitorowania poziomu zanieczyszczenia. Jednym z możliwych rozwiązań jest biomonitoring, polegający na badaniu organizmów żywych ekspozowanych na działanie szkodliwych czynników środowiskowych i analizie zmian wywołanych przez te czynniki w ich tkankach i komórkach [Stauber i in. 2000; Regel i in. 2002; Zhou i in. 2008].

Cytometria przepływowa jest metodą stosowaną przede wszystkim w diagnostyce medycznej. Rutynowo jest stosowana w hematologii, w diagnostyce, monitorowaniu i badaniach mechanizmów zaburzeń ze strony układu odpornościowego człowieka. Już od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku znajduje jednak zastosowanie w badaniach autotroficznych i heterotroficznych mikroorganizmów zasiedlających zbiorniki wodne [Yentsch i in. 1986; Troussellier i in. 1993; Franqueira i in. 2000; Stauber i in. 2002]. Działanie cytometru przepływowego opiera się na rejestracji rozproszenia światła i fluorescencji pojedynczych komórek przepływających przez wiązkę światła lasera. Dzięki temu cytometr przepływowy jest dobrym narzędziem do badania jednokomórkowych glonów wykazujących autofluorescencję [Regel i in. 2002; Stauber i in. 2005; Adler i in. 2007; Czechowska i in. 2008].

2. MATERIAŁY I METODY

Celem pracy jest próba oceny przydatności metody cytometrii przepływowej w badaniach zmian fluorescencji chlorofilu *Synechocysts aquatilis* pod wpływem wybranych metali ciężkich, co może pozwolić na wykorzystanie sinic jako bioindykatorów skażenia wód metalami ciężkimi.

Hodowla komórkowa. Sinice *Synechocystis aquatilis* SAUV. f. salina, szczep VAARA 1978/CB-3 zostały zakupione w Instytucie Botaniki Akademii Nauk Republiki Czeskiej (Třeboň, Czechy). Hodowla prowadzona była na pożywce o składzie opracowanym w Instytucie Fizyki Politechniki Poznańskiej.

W celu oceny wpływu soli metali ciężkich na fluorescencję chlorofilu sinice inkubowano w pożywce z dodatkiem każdej z następujących soli metali: AgNO_3 , HgCl_2 , CdCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, i ZnCl_2 .

Cytometria przepływowa. Pomiarów intensywności fluorescencji dokonano przy użyciu cytometru przepływowego FACScan Becton Dickinson wyposażonego w 15 mW laser argonowy emitujący światło o długości 488 nm. Komórki wybrakowano na podstawie rozproszenia światła lasera będącego wykładnikiem wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC) komórek. Fluorescencja chlorofilu była rejestrowana w kanale detekcji fluorescencji FL3 rejestrującym światło o długości >650 nm (rys. 1A). Analizy danych cytometrycznych dokonano za pomocą programu CellQuest (Becton Dickinson).

Analizę widma fluorescencji barwników *Synechocystis* wykonano również metodą spektroskopii fluorescencyjnej przy długości fali wzbudzenia 488 nm. Ponadto przeprowadzono pomiar widma absorpcji komórek *Synechocystis*.

3. WYNIKI BADAŃ

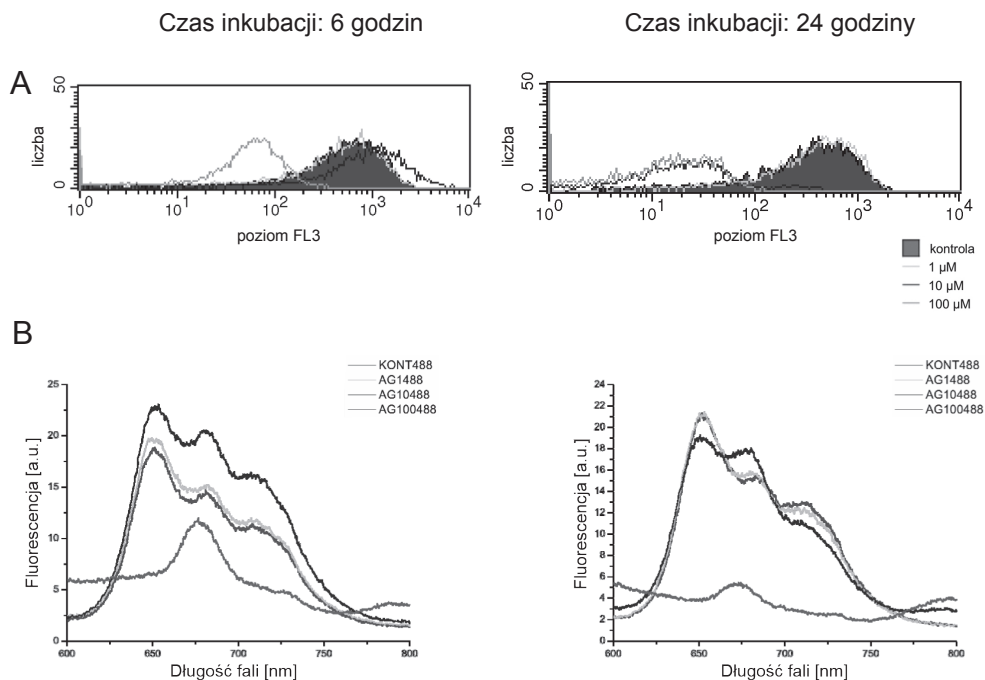
Badania cytometryczne komórek *Synechocystis* wykazały zmiany intensywności fluorescencji pod wpływem metali ciężkich. Nasilenie zmian było zależne od stężenia soli metali dodanych do medium hodowlanego i od czasu inkubacji komórek z metalami.

Sześciogodzinny czas inkubacji skutkowało wzrostem intensywności autofluorescencji w przypadku soli srebra (Ag), kadmu (Cd), miedzi (Cu), rtęci (Hg), ołowiu (Pb) i cynku (Zn), przy stężeniu soli równym 1 μM . Stężenie 10 μM wywołało wzrost intensywności autofluorescencji w przypadku soli Ag, Cd, Cu Pb i Zn. Sole rtęci w tym wypadku wywoływały spadek fluorescencji. Stężenie 100 μM powodowało znaczny spadek intensywności autofluorescencji w przypadku soli Ag, Cu i Hg oraz dalszy wzrost autofluorescencji w przypadku soli Cd, Pb i Zn (rys. 2A).

Dwudziestoczerogodzinny czas inkubacji powodował spadek intensywności autofluorescencji względem kontroli przy wszystkich zastosowanych stężeniach pod wpływem soli srebra i rtęci. Pod wpływem kadmu w stężeniu 1 μM intensywność fluorescencji pozostawała na poziomie równym kontroli lub nieznacznie malała.

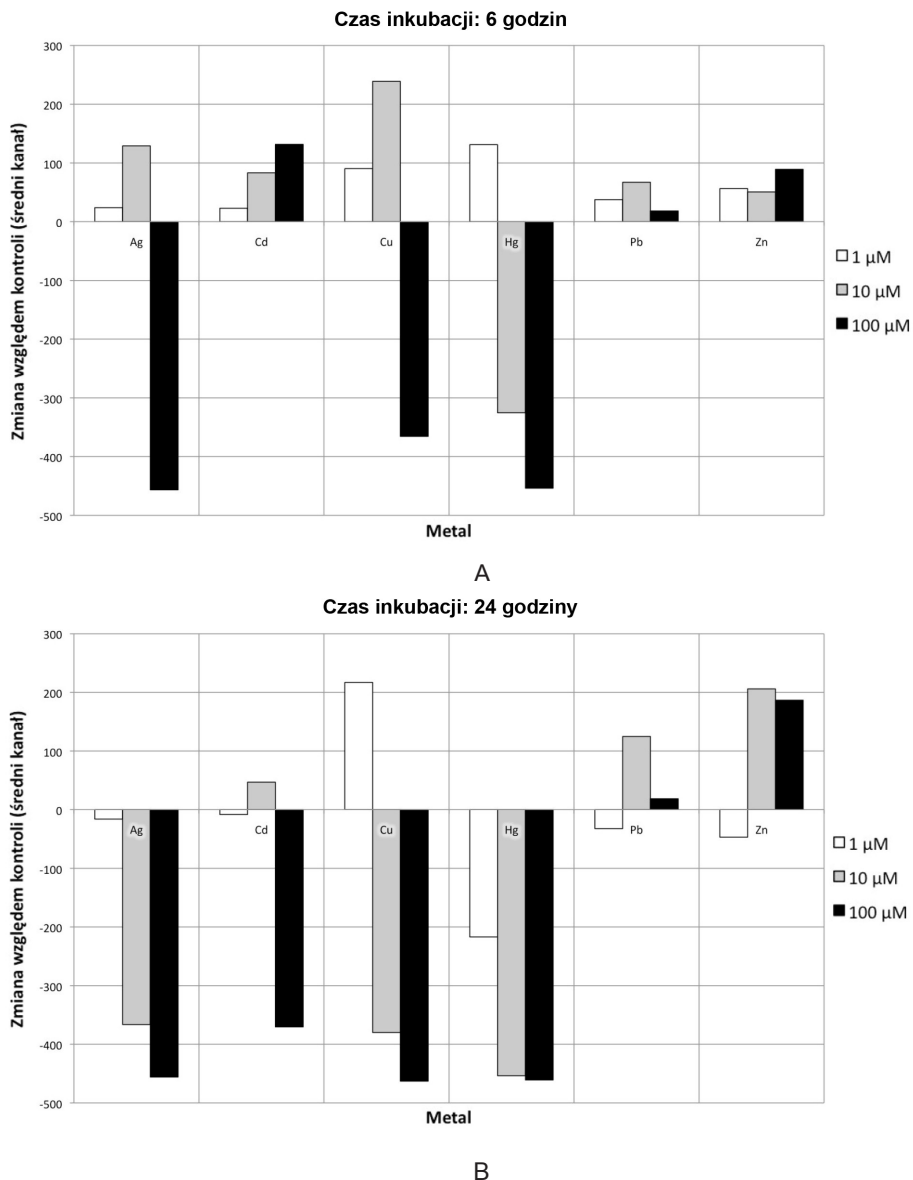
Stężenie 10 μM powodowało wzrost a 100 μM znaczny spadek fluorescencji. Miedź w tych warunkach powodowała wzrost przy najniższym stężeniu i spadek odpowiednio przy stężeniach 10 μM i 100 μM . Ołów i cynk powodowały spadek świecenia w najniższym stężeniu i wzrost przy wyższych stężeniach (rys. 2B).

W celu zbadania zmian w widmie fluorescencji przeprowadzono badania metodą spektroskopii fluorescencyjnej komórek *Synechocystis* hodowanych w takich samych warunkach (rys. 1B).



Rys. 1. A – Analiza cytometryczna zmian intensywności autofluorescencji komórek *Synechocystis* pod wpływem soli srebra. Zastosowanym stężeniom odpowiadają kolory: czerwony – kontrola, zielony – 1 μM , niebieski – 10 μM , różowy – 100 μM . Pomiaru dokonano w kanale detekcji fluorescencji FL3 rejestrującym świecenie z zakresie barwy czerwonej (>650 nm) odpowiadającej maksimum fluorescencji chlorofilu *a*. Zaprezentowane histogramy stanowią przykład reprezentatywny dla wykonanych eksperymentów; **B** – Zmiany fluorescencji komórek *Synechocystis* pod wpływem soli srebra po sześciogodzinnej i dwudziestoczworgodzinnej inkubacji, badane metodą spektroskopii fluorescencyjnej. Stężenie soli metali wynosiło odpowiednio 1 μM , 10 μM i 100 μM . Długość fali wzbudzenia wynosiła 488 nm

Fig. 1. A – Flow cytometric analysis of autofluorescence intensity changes in *Synechocystis* cells under the influence of salts of silver. The following colours refer to the concentrations applied: red – control, green – 1 μM , blue 10 μM , pink – 100 μM . These data were acquired in the FL3 fluorescence detector, detecting > 650 nm spectral band which covers the chlorophyll *a* fluorescence emission peak. The presented histograms are representative for the conducted analyses; **B** – Changes of fluorescence emission of *Synechocystis* cells under the influence of silver after six and twenty-four hours of incubation, measured by fluorescence spectroscopy. Concentrations of heavy metal salt solutions were 1 μM , 10 μM and 100 μM , respectively. The excitation wavelength applied was 488 nm



Rys. 2. Zestawienie wyników badań intensywności autofluorescencji przedstawione jako wartość zmiany intensywności fluorescencji próby poddanej działaniu soli metalu, względem intensywności fluorescencji kontroli. Pomiarów dokonano po sześciu (A) i dwudziestuczterech (B) godzinach

Fig. 2. Comparison of changes of autofluorescence emission levels presented as a change of fluorescence intensity versus control value. The acquisition was carried out after six (A) and twenty four (B) hours of incubation with heavy metal salt solutions

4. Dyskusja

Zjawisko fluorescencji chlorofilu jest od dawna wykorzystywane w badaniach wpływu na proces fotosyntezy wielu czynników stresowych, takich jak deficyt wody, nadmierne zasolenie, niska temperatura, metale ciężkie [Lu i in. 1999; Dhir i in. 2009; Dutta i in. 2009; Gimeno i in. 2009]. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Butlera i in. [1978], reakcje fotochemiczne w obrębie fotosystemu II współzawodniczą w procesie fotosyntezy z procesem fluorescencji i utratą energii w postaci ciepła. Transport elektronu z cząsteczki chlorofilu w centrum reakcji fotosystemu II (P680) na cząsteczkę plastochinonu w obrębie przenośnika Q_A , będącego pierwszym akceptorem elektronów, prowadzi do zjawiska fotochemicznego wygaszania fluorescencji. Wzrost utraty energii wzbudzenia w postaci ciepła skutkuje niefotochemicznym wygaszaniem fluorescencji. Tym samym emisja fluorescencji może być wykorzystywana do monitorowania zaburzeń w reakcjach fotochemicznych fotosyntezy. Należy jednak uwzględnić drogę rozpraszania energii w postaci ciepła, która nie zawsze pozostaje w równowadze z fluorescencją [Baker 2008].

Absorpcja fotonów i transfer energii do centrów reakcji (cząsteczka chlorofilu w obrębie fotoukładów I i II) zachodzi w błonach tylakoidów, które u sinic tworzą rozległy kompleks w peryferycznych częściach cytoplazmy [Tomo i in. 2008]. Barwniki uczestniczące w fotosyntezie są powiązane z białkami tylakoidów. Do barwników powiązanych z białkami integralnymi błon tylakoidów u większości sinic należą chlorofil a i karotenoidy pełniące funkcję fotoprotekcyjną. Te ostatnie wchodzi również w skład ściany komórkowej i plazmolemy [Hoiczuk i wsp 2000; van de Meene i in. 2006]. Wewnątrz cytoplazmy sinic znajdują się również fikobilisomy – struktury białkowe wiążące barwniki uczestniczące w fotosyntezie, takie jak fikocyjanina, allofikocyjanina i allofikocyjanina-B [Jordan i in. 2001]. Chlorofil i barwniki fikobilisomów wykazują maksimum fluorescencji w zakresie 640–700 nm. W warunkach *in vivo* intensywność fluorescencji barwników fikobilisomów jest ograniczona ze względu na wysoką wydajność transferu energii wzbudzenia na cząsteczkę chlorofilu. Przy długości fali wzbudzenia 488 nm, zastosowanej w omawianych badaniach, najsilniejszą absorpcję wykazują fikobiliny i karotenoidy spośród barwników *Synechocystis* uczestniczących w fotosyntezie [Vermaas i in. 2008].

Badania nad wpływem metali na aparat fotosyntetyczny roślin i sinic wskazują, że miejscem szczególnie wrażliwym na działanie metali ciężkich jest fotoukład II (PS II) [Campbell i in. 1998; Shcolnick i in. 2006]. Postulowane działanie srebra, kadmu i cynku polega na zahamowaniu transportu elektronów na etapie oderwania elektronu od cząsteczki wody. Wykazano również bezpośrednią inaktywację centrum reakcji fotoukładu II pod wpływem rtęci, niklu i chromu a także wpływ miedzi na wiele etapów łańcucha transportu elektronów w procesie fotosyntezy [Boucher i in. 1999; Mallick i in. 2003].

Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała istotne zmiany w poziomie autofluorescencji chlorofilu komórek *Synechocystis*. Wyniki te zostały potwierdzone bada-

niem widma fluorescencji metodą spektroskopii fluorescencyjnej. Zmiany fluorescencji odzwierciedlają stopień uszkodzeń wywołanych przez metale ciężkie w aparacie fotosyntetycznym badanych sinic. Zmiany fluorescencji po sześciogodzinnym czasie inkubacji, zachodzące na skutek zakłóceń fazy świetłej fotosyntezy wywołanych przez metale, wydają się być lepszym potencjalnym wskaźnikiem zanieczyszczenia, niż zmiany po dwudziestoczterogodzinnym czasie inkubacji. Wydaje się, że w wyniku dłuższej inkubacji efekt toksyczny jest tak silny, że prowadzi do rozpadu aparatu fotosyntetycznego *Synechocystis*.

Ocena intensywności autofluorescencji komórek *Synechocystis* metodą cytometrii przepływowej, wydaje się być ze względu na łatwą procedurę wykonania i szybkość analizy dogodną metodą badania zaburzeń fotosyntezy sinic, które mogą być wywołane działaniem metali ciężkich. Dalsze badania, uwzględniające w układzie doświadczalnym wiele czynników mogących zaistnieć w warunkach naturalnych, będą konieczne do oceny możliwości zastosowania sinic jako bioindykatorów.

Praca powstała w ramach projektu finansowanego przez KBN, nr 2 PO5D04630.

PIŚMIENICTWO

- ADLER N., SCHMITT-JANSEN M. et al. 2007. Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(2): 297–306.
- BAKER N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89–113.
- BOUCHER N., CARPENTIER R. 1999. Hg²⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺ – induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosyn. Res.* 59(2): 167–174.
- BUTLER W.L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*
- CAMPBELL D., HURRY V. et al. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 667–683.
- CZECHOWSKA K., JOHNSON D.R. et al. 2008. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 11(3): 205–212.
- DHIR B., SHARMILA P. et al. 2009. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- DUTTA S., MOHANTY S. et al. 2009. Role of Temperature Stress on Chloroplast Biogenesis and Protein Import in Pea. *Plant Physiol.* 150(2): 1050–1061.
- FRANQUEIRA D., OROSA M. et al. 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* 247(2–3): 119–126.

- GIMENO T.E., PÍAS B. et al. 2009. Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the responses of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. *Tree Physiol.* 29(1): 87–98.
- HOICZYK E., HANSEL A. 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182(5): 1191–1199.
- JORDAN P., FROMME P. et al. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411(6840): 909–917.
- LU C., ZHANG J. 1999. Effects of salt stress on PSII function and photoinhibition in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Plant Physiol.* 155(6): 740–745.
- MALLICK N., MOHN F.H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55(1): 64–69.
- MENDOLA P., MESSER L.C. et al. 2008. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil. Steril.* 89(2 Suppl): 81–94.
- REGEL R.H., FERRIS J.M. et al. 2002. Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquat. Toxicol.* 59(3–4): 209–223.
- RIER S.E. 2008. Environmental immune disruption: a comorbidity factor for reproduction? *Fertil. Steril.* 89(2 Suppl): 103–108.
- SHCOLNICK S., KEREN N. 2006. Metal homeostasis in cyanobacteria and chloroplasts. Balancing benefits and risks to the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol.* 141(3): 805–810.
- STAUBER J., DAVIES C. et al. 2000. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environ. Rev.* 8(4): 255–301.
- STAUBER J., FRANKLIN N. et al. 2005. *Microalgal Toxicity Tests Using Flow Cytometry*. W: Blaise C., Férard J., *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*. Springer Science & Business.
- STAUBER J.L., FRANKLIN N.M. et al. 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.* 20(4): 141–143.
- TOMO T., AKIMOTO S. et al. 2008. Isolation and spectral characterization of Photosystem II reaction center from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosyn. Res.* 98(1-3): 293–302.
- TROUSSELLIER M., COURTIES C. et al. 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biol. Cell.* 78(1–2): 111–121.
- VAN DE MEENE A.M., HOHMANN-MARRIOTT M. et al. 2006. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 184(5): 259–270.
- VERMAAS W.F., TIMLIN J.A. et al. 2008. In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(10): 4050–4055.

- WINDHAM G., FENSTER L. 2008. Environmental contaminants and pregnancy outcomes. *Fertil. Steril.* 89(2 Suppl): 111–116; discussion 117.
- YENTSCH C., POMPONI S. 1986. Automated individual cell analysis in aquatic research. *Int. Rev. Cytol.* 105: 183.
- ZHOU Q., ZHANG J. et al. 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta* 606(2): 135–150.