

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.355

Первичные процессы фотосинтеза *Thalassiosira weissflogii* при воздействии ципрофлоксацина

Д.А. Тодоренко^{1,*} , Н.Д. Сидоченко² , А.А. Байжуманов¹ ,
Л.Б. Братковская³ , Д.Н. Маторин¹

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Российский университет дружбы народов, Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

³Кафедра общей экологии и гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: todorenko@mail.bio.msu.ru

Фторхинолоновые антибиотики, такие как ципрофлоксацин, активно использовались в медицинской практике, в том числе в пандемию COVID-19, для подавления побочных бактериальных инфекций. Широкое применение и неправильная утилизация приводят к появлению антибиотиков в окружающей среде, что может оказывать воздействие на природные водные организмы, включая фитопланктон. Воздействие фторхинолоновых антибиотиков на процессы фотосинтеза диатомовых микроводорослей, которые являются основными продуцентами в морских экосистемах, мало изучено. В работе исследовано воздействие антибиотика ципрофлоксацина на первичные процессы фотосинтеза морской диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii*. Показано, что ципрофлоксацин воздействует на работу фотосистемы II (ФСII), препятствуя передаче поглощенной энергии от возбужденных молекул хлорофилла антенны к реакционному центру (РЦ) ФСII (Φ_{D_0}). При воздействии ципрофлоксацина выявлено снижение эффективности донирования электрона к $P680^+$ (F_V/F_O), ингибирование квантового выхода ФСII (F_V/F_M), снижение доли активных РЦ (ABS/RC) и увеличение диссипации поглощенной энергии на РЦ (DI_o/RC). Показано, что механизм действия ципрофлоксацина связан с повреждением РЦ ФСII. Ципрофлоксацин усиливает светочувствительность микроводорослей и вызывает увеличение количества продуктов перекисного окисления липидов. Предлагается использование параметров флуоресценции хлорофилла для анализа воздействия антибиотиков на микроводоросли.

Ключевые слова: морские диатомовые микроводоросли, кривые ОЖР, фторхинолоновые антибиотики, фотосистема II, флуоресценция хлорофилла, фотоингибирование

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-6

Введение

Фармацевтические препараты, включая антибиотики, являются опасными микрозагрязнителями окружающей среды из-за медленной деградации, повышенной персистентности и биотоксичности [1, 2]. Широкое использование антибиотиков в здравоохранении, сельском хозяйстве, птицеводстве и аквакультуре, а также неправильная утилизация привели к повсеместному их распространению в окружающей среде. Антибиотики лишь частично удаляются в ходе очистки сточных вод на очистных сооружениях и впоследствии попадают в поверхностные воды [3]. Антибиотики обычно обнаруживаются в концентрациях от нг/л до мкг/л в поверхностных, подземных и морских

водах [4–6], а в некоторых случаях даже на уровне мг/л [7]. В водной среде антибиотики могут быть токсичны для разных организмов, вызывая неблагоприятные последствия для водных экосистем в целом [8].

Фотосинтезирующие организмы являются основой пищевой цепи в водных экосистемах, и любые изменения в их жизнеспособности могут привести к серьезным последствиям на более высоких трофических уровнях. Несмотря на то, что целевым организмом, на который направлено действие антибиотиков, являются бактерии, антибиотики могут оказывать неблагоприятное воздействие и на эукариотические микроводоросли — в частности, на такие органеллы, как ми-

тохондрии и хлоропласты, имеющие собственный геном [9].

Одним из наиболее активно используемых антибиотиков широкого спектра действия в медицине и ветеринарии является ципрофлоксацин (ЦФ), относящийся к группе фторхинолонов. Фторхинолоновые антибиотики широко использовались в пандемию COVID-19 для подавления побочных бактериальных инфекций [10]. ЦФ эффективен в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий за счет нарушения синтеза бактериальной ДНК путем ингибирования лигазной активности ферментов: топоизомеразы II (ДНК-гиразы) и ДНК-топоизомеразы IV. ЦФ является распространенным загрязнителем окружающей среды [1]. Известно, что фторхинолоновые антибиотики устойчивы к биodeградации, поэтому остатки фторхинолонов и их производных обнаруживаются в природных водоемах. Мировая медиана концентрации ЦФ в пресноводных экосистемах составляет 0,164 мг/л, а его максимальная обнаруженная концентрация — 6,5 мг/л [11]. Фторхинолоны могут оказывать токсическое воздействие на микроводоросли, что может приводить к нарушению их жизненных процессов [12–14]. Имеющиеся данные о токсичности ЦФ для микроводорослей в основном выполнены на зеленых пресноводных микроводорослях, тогда как мало данных о воздействии ЦФ на морские диатомовые микроводоросли, которые являются основой фотосинтетической продукции морских экосистем. В настоящей работе исследовано воздействие ЦФ в разных концентрациях на первичные процессы фотосинтеза, связанные с поглощением квантов света, преобразованием поглощенной энергии в реакционных центрах (РЦ) и фотосинтетическим электронным транспортом, у диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.A. Fryxell & Hasle 1977 с помощью снятия световых и индукционных кривых флуоресценции хлорофилла.

Материалы и методы

Объектом исследования служила чистая культура морской одноклеточной диатомовой микроводоросли *T. weissflogii* из коллекции кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Культуру выращивали на питательной среде f/2, приготовленной на искусственной морской воде с концентрацией соли 17 г/л. Микроводоросли культивировали в колбе Эрленмейера объемом 100 мл при непрерывном освещении с плотностью потока квантов 50 мкмоль фотонов/м²·с при температуре 23 ± 1°C и постоянном перемешивании (120 об./мин) в течение 4 сут; плотность клеток достигала ~4,7 × 10⁵ кл/мл.

В качестве токсиканта использовали антибиотик ЦФ (98% активного вещества) (Келун-Каз-

фарм, Казахстан) в форме водного раствора, который добавляли в концентрациях от 5 до 50 мг/л в свежую среду с микроводорослями. Начальная концентрация клеток микроводорослей в эксперименте составила 5 · 10⁴ кл/мл. Микроводоросли с антибиотиком в разных концентрациях экспонировали в течение 3 сут в тех же условиях, что и при выращивании маточной культуры микроводорослей. Количество клеток оценивали путем прямого счета в камере Горяева и измерения оптической плотности ($D_{677\text{нм}} - D_{730\text{нм}}$, $L = 1$ см) с помощью спектрофотометра, созданного на кафедре биофизики с использованием портативного спектрометра USB 2000 (Ocean Optics Inc., США).

Кинетические кривые флуоресценции хлорофилла (ОЛР) регистрировали с помощью флуориметра Aquapen-C 100 (Photon System Instruments, Чехия). Флуоресценцию индуцировали синим светом с длиной волны 455 нм в течение 2 с при плотности потока квантов 3000 мкмоль фотонов/м²·с. Перед регистрацией образцы адаптировали к темноте. Кривые ОЛР анализировали с помощью JIP-теста в соответствии с опубликованной ранее работой [15], где представлены расчет параметров флуоресценции и их описание.

Быстрые световые кривые регистрировали на флуориметре Water-PAM (Walz, Германия) с импульсно-амплитудной модуляцией при последовательном увеличении интенсивности действующего света (0–1400 мкмоль фотонов/м²·с); продолжительность каждого из световых сеансов действующего света составляла 20 с. На каждом уровне освещенности квантовая эффективность ФСII ($\phi_{\text{ФСII}} = (F_M' - F_t)/F_M'$) регистрировалась при световом импульсе 3000 мкмоль/м²·с в течение 0,8 с. F_t представляет собой текущий выход флуоресценции на свету, измеренный с помощью модулирующего света (<1 мкмоль фотонов/м²·с) непосредственно перед импульсом насыщения. Относительную скорость линейного электронного транспорта (electron transport rate, далее ETR) рассчитывали как $\text{ETR} = \phi_{\text{ФСII}} \times \text{интенсивность света} \times 0,5$. Из световой кривой ETR рассчитывали следующие параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой — α) и максимальную относительную скорость электронов по электротранспортной цепи (ETR_{max}). Обозначения и описание параметров флуоресценции представлены в соответствии с общепринятой номенклатурой [16].

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клетках микроводорослей оценивали путем измерения содержания продуктов взаимодействия конечных продуктов ПОЛ с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) — ТБК-активные продукты — согласно описанной ранее методике [17] с небольшими модификациями. К 200 мкл суспензии клеток водоросли добавляли 1 мл раствора 0,25%-ной ТБК в 10%-ной трихлоруксусной кислоте. Полученные

Таблица

Параметры флуоресценции диатомовой микроводоросли *T. weissflogii* на 3 сут инкубации с антибиотиком ЦФ в разной концентрации

| Параметры флуоресценции | Контроль | 5 мг/л | 10 мг/л | 25 мг/л | 50 мг/л |
|--------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| V_J | $0,44 \pm 0,002$ | $0,48 \pm 0,007^*$ | $0,52 \pm 0,005^*$ | $0,49 \pm 0,016^*$ | $0,41 \pm 0,031$ |
| F_V/F_M | $0,7 \pm 0,001$ | $0,65 \pm 0,004^*$ | $0,41 \pm 0,002^*$ | $0,25 \pm 0,004^*$ | $0,14 \pm 0,006^*$ |
| F_V/F_O | $2,37 \pm 0,01$ | $1,84 \pm 0,03^*$ | $0,71 \pm 0,004^*$ | $0,32 \pm 0,01^*$ | $0,17 \pm 0,01^*$ |
| ψ_{Eo} | $0,56 \pm 0,002$ | $0,52 \pm 0,007^*$ | $0,48 \pm 0,005^*$ | $0,51 \pm 0,016^*$ | $0,59 \pm 0,031$ |
| $\phi_{Do} (= F_O/F_M)$ | $0,3 \pm 0,001$ | $0,35 \pm 0,004^*$ | $0,59 \pm 0,002^*$ | $0,76 \pm 0,004^*$ | $0,86 \pm 0,006^*$ |
| PI_{ABS} | $0,93 \pm 0,003$ | $0,54 \pm 0,031^*$ | $0,1 \pm 0,003^*$ | $0,03 \pm 0,003^*$ | $0,01 \pm 0,003^*$ |
| ABS/RC | $3,18 \pm 0,02$ | $3,69 \pm 0,1$ | $6,55 \pm 0,08^*$ | $11,86 \pm 0,5^*$ | $21,2 \pm 1,94^*$ |
| DI_o/RC | $0,94 \pm 0,01$ | $1,3 \pm 0,04$ | $3,83 \pm 0,04^*$ | $8,96 \pm 0,42^*$ | $18,17 \pm 1,78^*$ |
| Площадь над кривой OJIP (Area) | 326588 ± 5413 | $257194 \pm 15806^*$ | $367795 \pm 11967^*$ | $211231 \pm 13344^*$ | $195675 \pm 22077^*$ |
| Доля KBK (OEC fraction) | 1 | 0,90 | 0,64 | 0,46 | 0,32 |
| ETR_{max} | 158 ± 5 | $135 \pm 6^*$ | $100 \pm 1^*$ | $39 \pm 6^*$ | $26 \pm 0,4^*$ |
| α | $0,23 \pm 0,004$ | $0,19 \pm 0,012^*$ | $0,15 \pm 0,001^*$ | $0,06 \pm 0,01^*$ | $0,04 \pm 0,001^*$ |

Примечание: * – статически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$)

пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре 95°C на водяной бане, после чего пробирки охлаждали 5 мин при температуре 0°C. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об./мин. Поглощение света регистрировали при 532 и 600 нм. Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакеты программ Origin (OriginLab Corp., США) и Statistica v.10 (StatSoft, Inc., США). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (апостериорный тест Даннетта). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. В таблице представлены значения среднего (M) и стандартные отклонения ($\pm SD$). Для каждого исследуемого параметра выполнено три повтора, кроме эксперимента по фотоингибированию, где измерения проводились в одной повторности из-за особенностей самого эксперимента.

Результаты и обсуждение

Культуру *T. weissflogii* инкубировали в течение 3 сут без ЦФ и в присутствии антибиотика в различных концентрациях – 5, 10, 25 и 50 мг/л. В контроле концентрация клеток увеличивалась с $5 \cdot 10^4$ кл/мл до $\sim 2,8 \cdot 10^5$ кл/мл. Количество клеток *T. weissflogii* несколько увеличивалось в присутствии ЦФ в низких концентрациях на 8 и 22 % при 5 и 10 мг/л соответственно (рис. 1). Стимулирование скорости роста микроводорослей в присутствии антибиотиков в низких концентрациях отмечалось ранее в литературе [18, 19]. При воздействии ЦФ в концентрациях 25 и 50 мг/л наблюдали уменьшение концентрации клеток на 17 и 39 % соответственно (рис. 1). Наши результаты

согласуются с более ранними работами на зеленых пресноводных водорослях, в которых показано снижение скорости роста при кратковременном воздействии ЦФ в высоких концентрациях [14].

Для оценки воздействия ЦФ на фотосинтетическую активность и электронотранспортные процессы *T. weissflogii* регистрировали кривые OJIP и световые кривые флуоресценции хлорофилла. На рис. 2 представлены световые кривые ϕ_{FSC} и ETR *T. weissflogii* после 3-суточной инкубации с ЦФ. Параметр ϕ_{FSC} характеризует долю поглощенной энергии, которая используется в фотохимических реакциях в ФСП и коррелирует с квантовой эффективностью фиксации CO_2 в отсутствие фотодыхания и реакции Мелера [20]. В адаптированном к темноте объекте значение ϕ_{FSC} равно величине F_V/F_M , которая является потенциальным квантовым выходом ФСП. Начальное значение ϕ_{FSC} при 0 мкмоль фотонов/м²·с ($= F_V/F_M$) в контроле

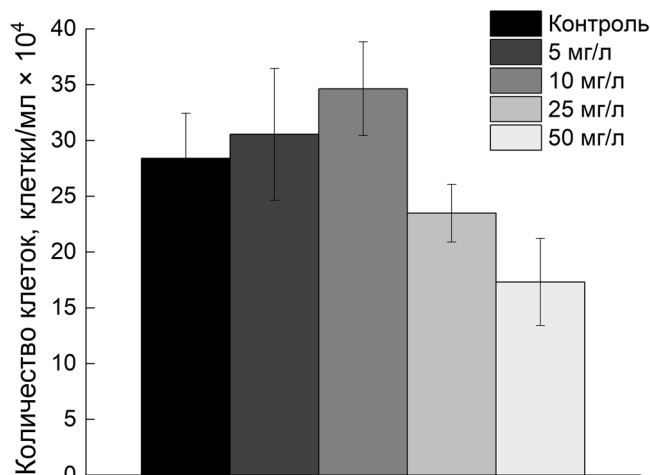


Рис. 1. Количество клеток *T. weissflogii* на 3 сут инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

составило $0,71 \pm 0,003$, что свидетельствует о достаточно высокой фотосинтетической активности клеток *T. weissflogii* (рис. 2А). В присутствии ЦФ происходило значительное ($p < 0,05$) снижение F_V/F_M . Значения данного параметра при воздействии 5, 10, 25 и 50 мг/л ЦФ составили $0,64 \pm 0,01$, $0,44 \pm 0,002$, $0,21 \pm 0,02$ и $0,16 \pm 0,003$ соответственно. По мере увеличения интенсивности действующего света происходило уменьшение $\phi_{\text{ФСII}}$ как в контроле, так и при воздействии ЦФ, связанное с увеличением тепловой диссипации избыточной световой энергии, когда энергия не используется в реакциях фотосинтеза. На основании параметра $\phi_{\text{ФСII}}$ можно рассчитать относительную скорость ETR при умножении интенсивности освещения на $\phi_{\text{ФСII}}$. Кривая зависимости ETR от интенсивности освещения имеет классическую форму кривой P-I (фотосинтез-освещенность) с линейным светолимитированным участком, а также участком, где кривая выходит на плато, когда достигается световое насыщение ETR. Дальнейшее увеличение интенсивности света не влияет на скорость фотосинтеза и может даже приводить к ее уменьшению (участок динамического фотоингибирования). На рис. 2Б представлены кривые ETR водорослей *T. weissflogii* в контроле и при воздействии ЦФ. В присутствии ЦФ происходило уменьшение интенсивности ETR по сравнению с контролем. Из световой кривой ETR рассчитывали параметры, представленные в таблице. При воздействии ЦФ выявлено уменьшение максимальной скорости линейного электронного транспорта (ETR_{max}) и уменьшение угла наклона линейного участка световой кривой ETR (α), что свидетельствует о снижении утилизации поглощенной энергии в процессе фотосинтеза.

Для того чтобы оценить воздействие ЦФ на определенные участки фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) *T. weissflogii*, мы регистрировали кривые ОЖР и анализировали их с помощью JIP-теста. На рис. 3 представлены кривые ОЖР *T. weissflogii* после 3-суточной инкубации с ЦФ. В кинетике индукции флуоресценции культуры *T. weissflogii* в ответ на свет высокой интенсивности наблюдалось несколько фаз, известных как переходы O-J-I-P [15]. Начальный уровень фазы O при 50 мкс соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при «открытых» РЦ ФСII (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 в результате восстановления акцепторов Q_B и пула пластохинонов (PQ). Во время фазы I-P происходит полное восстановление PQ-пула, что приводит к «закрытию» (восстановлению) РЦ ФСII (F_M). Как видно из представленного рисунка, кривые ОЖР *T. weissflogii* при воздействии ЦФ претерпевали значительные изменения. При воздействии минимальной концентрации ЦФ 5 мг/л происходило уменьшение фазы J-I-P, связанное с нарушением электронного транспорта от Q_A в PQ-пул [21]. По мере увеличения концентрации антибиотика отмечалось увеличение уровня O (F_O) и снижение уровней J, I и P (F_M). Существенное увеличение O при воздействии ЦФ может быть обусловлено возрастанием эмиссии флуоресценции хлорофилла в антенных комплексах за счет нарушения миграции энергии к РЦ, либо частичным восстановлением пула PQ в темноте, а снижение P указывает на накопление неактивных РЦ ФСII. В присутствии ЦФ выявлено

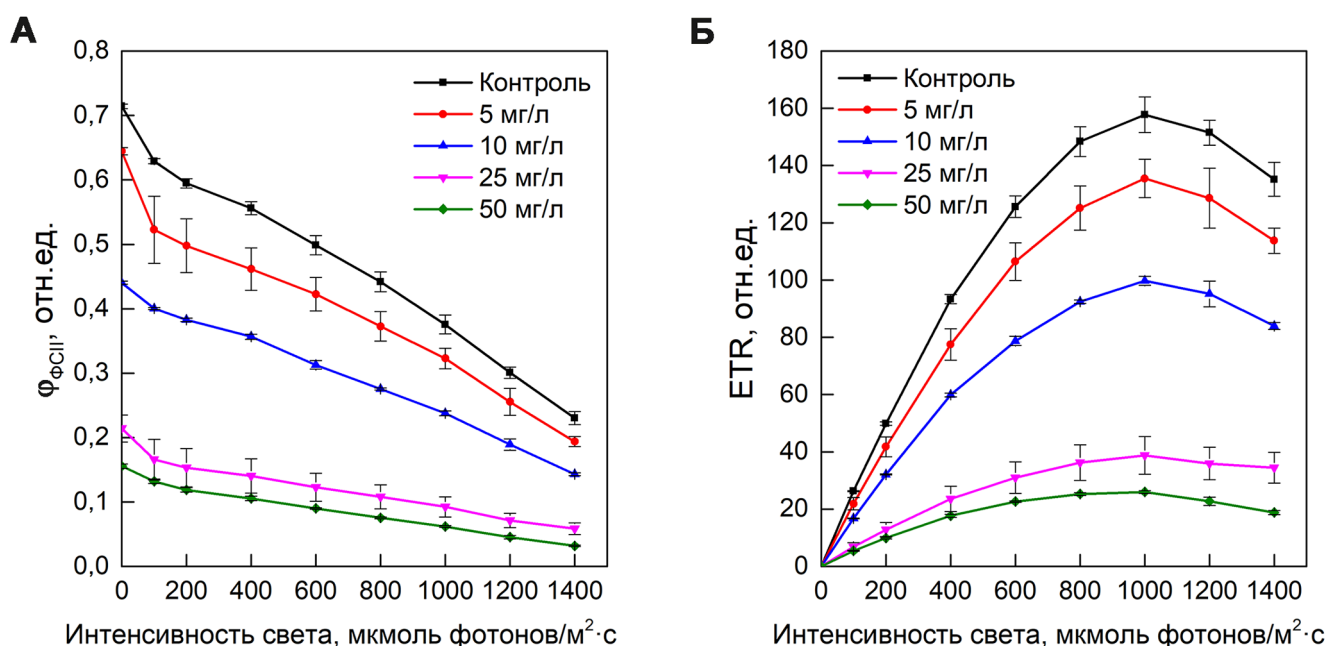


Рис. 2. Световые кривые эффективного квантового выхода ФСII ($\phi_{\text{ФСII}}$) (А) и относительного линейного электронного транспорта (ETR) (Б) *T. weissflogii* на 3 сут инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

снижение площади над индукционной кривой ОЛР (параметр Area), характеризующее уменьшение размера пула электронных акцепторов до полного восстановления Q_A на акцепторной стороне ФСII (таблица). В значительной степени кривые ОЛР изменялись при воздействии ЦФ в максимальной концентрации 50 мг/л, при которой пики J, I, P на кривой практически отсутствовали, а уровень O возрастал.

Известно, что фторхинолоновые антибиотики снижают скорость выделения O_2 фотосинтезирующими клетками [22]. Активность работы кислород-выделяющего комплекса (КВК) мы оценивали по изменению выхода флуоресценции в районе 300 мкс (пик К) по формуле $V_K = (F_{300 \text{ мкс}} - F_O) / F_V$. У растений, подверженных высоким температурам и другим видам стресса, наблюдается пик К между O и J, связанный с электронным дисбалансом на акцепторной и донорной сторонах ФСII, при котором увеличивается отток электронов от P680 к акцепторам ФСII и снижается приток электронов с донорной стороны ФСII к P680⁺ [23]. Используя эту информацию, можно рассчитать долю КВК (ОЕС fraction) через

$$\frac{\left[1 - \frac{V_K}{V_J}\right] \text{ЦФ}}{\left[1 - \frac{V_K}{V_J}\right] \text{контроль}}.$$

В присутствии ЦФ у микроводорослей обнаружено уменьшение доли КВК (таблица) при воздействии ЦФ относительно контроля, что указывает на повреждающее действие ЦФ на КВК. Отношение F_V/F_O отражает эффективность донирования электрона к P680⁺ и фотосинтетическую конверсию в РЦ ФСII [24]. При воздействии ЦФ выявлено ($p < 0,05$) уменьшение F_V/F_O из-за снижения оттока электронов с донорной стороны в результате повреждения комплексов ФСII (таблица).

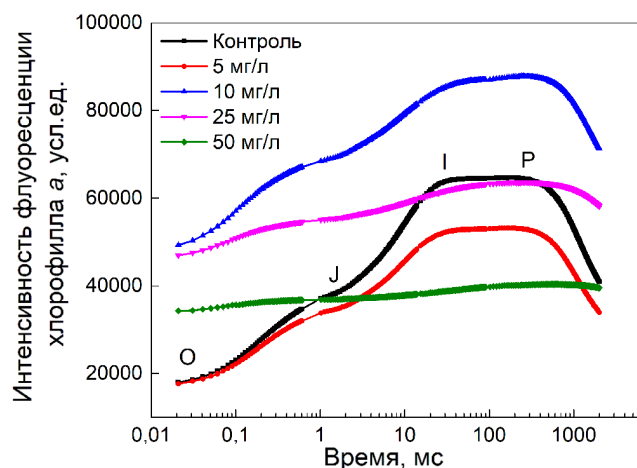


Рис. 3. Кинетические кривые флуоресценции хлорофилла (ОЛР) *T. weissflogii* на 3 сутки инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

Известно, что амплитуда фазы О-Ј в бесстрессовых условиях отражает количество восстановленных («закрытых») РЦ по отношению к общему числу РЦ, которые могут быть восстановлены («закрыты») [25]. Значительный рост амплитуды фазы О-Ј (рост параметра V_J) отражает увеличение общего числа «закрытых» РЦ, неспособных к реокислению Q_A^- и восстановлению вторичного хинонового акцептора Q_B . Доказательством является действие ингибитора электронного транспорта диурона, который конкурирует со вторичным хиноном Q_B за место связывания на белке D1 [15, 16]. Это приводит к нарушению электронного транспорта между Q_A и Q_B , и восстановлению кривых ОЛР в точке J (увеличению V_J). Результаты нашего исследования показали, что ЦФ не вызывает существенного накопления восстановленных РЦ, вследствие чего электронный транспорт за пределы Q_A (ψ_{Eo}) также существенно не снижается (таблица). Отсутствие значительного воздействия ЦФ на акцепторную сторону ФСII обусловлено тем, что ЦФ не проявляет сильной конкуренции с Q_B за связывание на D1-белке в ФСII в отличие от другого антибактериального препарата – налидиксовой кислоты [26]. При воздействии ЦФ квантовая эффективность ФСII (F_V/F_M) снижалась в результате накопления поврежденных комплексов ФСII, неспособных к фотохимическому преобразованию поглощенной энергии. Снижение доли активных РЦ проявлялось в увеличении отношения размера антенны на РЦ (ABS/RC), отражающего увеличение поглощенной энергии на РЦ. Поскольку неактивные РЦ не способны к фотохимическому разделению заряда, то увеличение скорости диссипации энергии захваченных антенной фотонов вызывает увеличение параметра рассеяния поглощенной энергии на РЦ (DI_o/RC). В связи со снижением доли активных РЦ в присутствии ЦФ также наблюдали увеличение квантовой эффективности диссипации поглощенной энергии (ϕ_{Do}) в результате нарушения миграции энергии от антенных комплексов к неактивным РЦ. Наши результаты согласуются с данными ранее опубликованной работы [26], авторы которой показали *in vitro* на тилакоидах шпината, что ЦФ препятствует передаче энергии от возбужденных молекул хлорофилла антенны к РЦ ФСII и, тем самым, снижает вероятность разделения зарядов в РЦ. Параметр PI_{ABS} отражает функциональное состояние ФСII и является интегральным параметром, включающим в себя произведение таких параметров как ABS/RC, F_V/F_M и ψ_{Eo} [15]. При воздействии ЦФ выявлено существенное снижение PI_{ABS} , отражающее снижение функционального состояния ФСII – главным образом, в результате уменьшения доли активных РЦ (увеличение ABS/RC) и снижения F_V/F_M .

Некоторые антибиотики, такие как хлорамфеникол, линкомицин и левомицетин, способны блокировать цикл репарации ФСII после фотоингибирования, останавливая синтез D1-белка в хлоропласте [27]. Белок D1 является одним из ключевых белков ФСII, формирующим основу РЦ ФСII вместе с D2-белком, на которых расположены переносчики электронов. Поскольку процесс фотоингибирования, т.е. снижения фотосинтетической активности под воздействием избыточного света, во многом связан со снижением активности ФСII, то наиболее подходящими методами для оценки степени фотоингибирования являются регистрация скорости выделения O_2 клетками и параметра F_V/F_M [28]. В условиях повреждения РЦ ФСII величина F_V/F_M линейно коррелирует со скоростью выделения O_2 [29], а снижение F_V/F_M связано со степенью деградации белка D1 [30]. Для того чтобы оценить воздействие ЦФ на репарацию D1-белка *T. weissflogii* после фотоингибирования, мы инкубировали пробы с ЦФ и без него (контроль) в течение 0,5 ч на слабом свете (8 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$), затем освещали образцы светом высокой интенсивности (2000 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$) в течение 0,5 ч, после чего экспонировали образцы при 8 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$ в течение 24 ч. На рис. 4 представлено изменение параметра F_V/F_M *T. weissflogii* в контроле и в присутствии ЦФ и хлорамфеникола. Как видно из рисунка, после применения света высокой интенсивности происходило снижение F_V/F_M с 0,67 до 0,25 в контроле (свет), и с 0,66 до 0,2 в присутствии ЦФ (свет) и хлорамфеникола (свет). В пробах контроля (темнота) и ЦФ (темнота), не подвергшихся световому стрессу, величина параметра F_V/F_M не менялась в течение 24 ч инкубации. После светового воздействия пробы с контролем и антибиотиками оставляли восстанавливаться на слабом свете, регистрируя F_V/F_M через 0,5, 1, 3 и 24 ч после фотоингибирования. В присутствии ЦФ активность ФСII восстанавливалась до практически начальных значений, зарегистрированных до фотоингибирования, хотя и с некоторой задержкой по сравнению с контролем. Таким образом, показано, что ЦФ не влияет на репарацию D1-белка *T. weissflogii* после фотоингибирования в отличие от хлорамфеникола.

Различные токсиканты способны вызывать окислительный стресс в клетках микроводорослей, стимулируя образование активных форм кислорода [31]. Они инициируют ПОЛ, которое является индикатором повреждения клеточных мембран. В результате ПОЛ образуются конечные метаболиты, такие как малоновый диальдегид, реагирующие с ТБК, известные как ТБК-активные продукты. На рис. 5 представлено содержание ТБК-активных продуктов *T. weissflogii* в контроле и в присутствии ЦФ. Как видно из представленного рисунка, ЦФ в концентрации до 50 мг/л не

оказывал статистически значимого воздействия на содержание ТБК-активных продуктов, тогда как в концентрации 50 мг/л вызывал увеличение количества ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем. Наши результаты согласуются с данными, полученными на зеленых микроводорослях, для которых показали увеличение продуктов ПОЛ при воздействии ЦФ [12, 13]. Увеличение количества ТБК-активных продуктов при воздействии ЦФ в высоких концентрациях свидетельствует о том, что данный антибиотик индуцирует окислительный стресс у *T. weissflogii*, вызывая структурные и функциональные повреждения фотосинтетического аппарата.

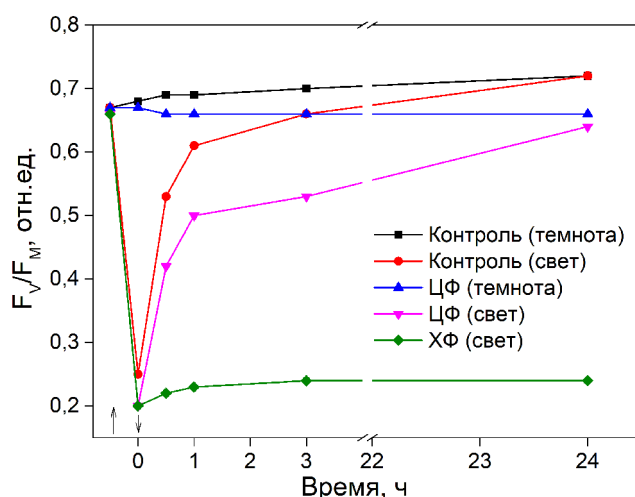


Рис. 4. Изменение параметра F_V/F_M культуры микроводоросли *T. weissflogii* в контроле и в присутствии ципрофлоксацина в концентрации 100 мг/л при повышенной освещенности 2000 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$ в течение 30 мин и последующей экспозиции на слабом свете 8 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$. Стрелками показано включение (↑) и выключение (↓) избыточного света. XФ — хлорамфеникол в концентрации 100 мг/л

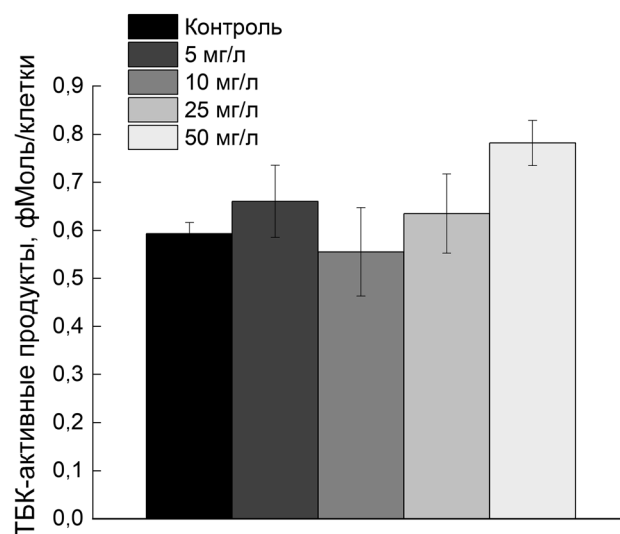


Рис. 5. Содержание ТБК-активных продуктов в клетках *T. weissflogii* на 3-и сут инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

Таким образом, проведенные исследования выявили чувствительность к воздействию ЦФ морских диатомовых микроводорослей, являющихся основными продуцентами в морских экосистемах. Результаты показали, что ЦФ снижает эффективность фотосинтеза этих микроводорослей на уровне ФСII (F_V/F_M). В присутствии ЦФ наблюдали увеличение квантовой эффективности рассеяния поглощенной энергии (ϕ_{D_0}) — по-видимому, в результате нарушения миграции энергии от антенных комплексов к РЦ. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными [26], полученными *in vitro* на тилакоидах шпината, согласно которым ЦФ препятствует передаче энергии от возбужденных молекул хлорофилла антенны к РЦ ФСII и, тем самым, снижает вероятность разделения зарядов в РЦ. Возможно также снижение оттока электронов с донорной стороны ФСII (F_V/F_0 , V_K , ОЕС fraction). Эти из-

менения приводят к уменьшению доли фотохимически активных РЦ (ABS/RC) и увеличению DI_0/RC . Наши данные свидетельствуют о том, что ЦФ может индуцировать окислительный стресс у диатомовых водорослей, также вызывая структурные и функциональные повреждения фотосинтетического аппарата. Флуоресценция хлорофилла является чувствительным методом и поэтому возможно использование примененных параметров флуоресценции для анализа воздействия антибиотиков на природные популяции фитопланктона *in situ*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-11-00009). Работу проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Doorslaer X., Dewulf J., Van Langenhove H., Demeestere K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.* 2014;500–501:250–269.
2. Eregowda T., Mohapatra S. Fate of micropollutants in engineered and natural environment. *Resilience, response, and risk in water systems*. Eds. M. Kumar, F. Munoz-Arriola, H. Furumai, and T. Chaminda. Singapore: Springer; 2020:283–301.
3. Omufere L.O., Maseko B., Olowoyo J.O. Occurrence of antibiotics in wastewater from hospital and convectional wastewater treatment plants and their impact on the effluent receiving rivers: current knowledge between 2010 and 2019. *Environ. Monit. Assess.* 2022;194(4):306.
4. Lalumera G.M., Calamari D., Galli P. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere.* 2004;54(5):661–668.
5. Yang S., Carlson K.H. Solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and wastewater matrices. *J. Chromatogr. A.* 2004;1038(1–2):141–155.
6. Santos L.H.M.L.M., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 2010;175(1–3):45–95.
7. Kümmerer K. Drugs in the environment, emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources review. *Chemosphere.* 2001;45(6–7):957–969.
8. Kovalakova P., Cizmas L., McDonald T.J., Marsalek B., Feng M., Sharma V.K. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere.* 2020;251:126351.
9. Vannini C., Domingo G., Marsoni M., Mattia F.D., Labra M., Castiglioni S., Bracale M. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquat. Toxicol.* 2011;101(2):459–465.
10. Karampela I., Dalamaga M. Could respiratory fluoroquinolones, levofloxacin and moxifloxacin, prove to be beneficial as an adjunct treatment in COVID-19? *Arch. Med. Res.* 2020;51(7):741–742.
11. Hughes S.R., Kay P., Brown L.E. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environ. Sci. Technol.* 2013;47(2):661–677.
12. Liu B.Y., Nie X.P., Liu W.Q., Snoeijis P., Guan C., Tsui M.T.K. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011;74(4):1027–1035.
13. Nie X.P., Liu B.Y., Yu H.J., Liu W.Q., Yang Y.F. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Pollut.* 2013;172:23–32.
14. Xiong J., Kurade M.B., Kim J.R., Roh H., Jeon B. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *J. Hazard. Mater.* 2017;323(Part A):212–219.
15. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivasta A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. *Chlorophyll *a* fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19*. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; 2004:321–362.
16. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. *Chlorophyll *a* fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19*. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; 2004:279–319.
17. Stewart R.R.C., Bewley J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 1980;65(2):245–248.
18. Yang L.H., Ying G.G., Su H.C., Stauber J.L., Adams M.S., Binet M.T. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater

microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008;27(5):1201–1208.

19. Chen Q., Zhang L., Han Y., Fang J., Wang H. Degradation and metabolic pathways of sulfamethazine and enrofloxacin in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* treatment systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020;27:28198–28208.

20. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989;990(1):87–92.

21. Антал Т.К., Граевская Е.Э., Маторин Д.Н., Волгушева А.А., Осипов В.А., Кренделева Т.Е., Рубин А.Б. Исследование влияния ионов метилртути и меди на первичные процессы фотосинтеза у зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* с использованием параметров кинетических кривых переменной флуоресценции хлорофилла. *Биофизика.* 2009;54(4):681–687.

22. Pan X., Zhang D., Chen X., Mu G., Li L., Bao A. Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis* sp. *Chemosphere.* 2009;77(3):413–418.

23. Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Łukasik I., Goltsev V., Ladle, R.J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol. Plant.* 2016;38:102.

24. Joshi M.K., Mohanty P. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal Ion toxicity in plants. *Chlorophyll*

a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; 2004:637–661.

25. Lázár D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 2006;33(1):9–30.

26. Aristilde L., Melis A., Sposito G. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environ. Sci. Technol.* 2010;44(4):1444–1450.

27. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1767(6):414–421.

28. Tyystjärvi E. Photoinhibition of Photosystem II. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2013;300:243–303.

29. Pätsikkä E., Aro E.-M., Tyystjärvi E. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity *in vivo*. *Plant Physiol.* 1998;117(2):619–627.

30. Rintamäki E., Salo R., Lehtonen E., Aro E.-M. Regulation of D1- protein degradation during photoinhibition of photosystem II *in vivo*: phosphorylation of the D1 protein in various plant groups. *Planta.* 1995;195(3):379–386.

31. Pinto E., Sigaud-kutner T.K.S., Leitão M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 2003;39(6):1008–1018.

Поступила в редакцию 22.05.2023

После доработки 17.10.2023

Принята в печать 25.10.2023

RESEARCH ARTICLE

Primary photosynthetic processes of *Thalassiosira weissflogii* under the effect of ciprofloxacin

D.A. Todorenko^{1,*} , N.D. Sidochenko² , A.A. Baizhumanov¹ ,
L.B. Bratkovskaya³ , D.N. Matorin¹ 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russia;

³Department of General Ecology and Hydrobiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: todorenko@mail.bio.msu.ru

Fluoroquinolone antibiotics such as ciprofloxacin have been actively used in medical practice, including the COVID-19 pandemic, to suppress adverse bacterial infections. Widespread application and improper disposal have resulted in the ubiquity of antibiotics in the environment, which can affect aquatic life, including phytoplankton. The effect of fluoroquinolone antibiotics on the photosynthetic processes of marine diatoms, which are the main producers in marine ecosystems, has been little studied. In this work the effect of the antibiotic ciprofloxacin on the primary photosynthetic processes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* was studied. It has been shown that ciprofloxacin affects the functioning of PSII, preventing the transfer of absorbed energy from the excited antenna chlorophyll molecules to the PSII RC (ϕ_{D_0}). Under the influence of ciprofloxacin, a decrease in the efficiency of electron donation to P680⁺ (F_V/F_0), inhibition of the quantum yield of PSII (F_V/F_M), a decrease in the proportion of active RCs (ABS/RC), and an increase in the dissipation of absorbed energy in RCs (DI_0/RC) were revealed. It has been shown that the

mechanism of action of ciprofloxacin is associated with damage of PSII RC. Ciprofloxacin enhances the photosensitivity of microalgae and causes an increase in lipid peroxidation products. It is proposed to apply the parameters of chlorophyll fluorescence analyzing the effect of antibiotics on microalgae.

Keywords: *marine diatoms, OJIP curves, fluoroquinolone antibiotics, photosystem II, chlorophyll fluorescence, photoinhibition*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-11-00009.

Сведения об авторах

Тодоренко Дарья Алексеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: todorenko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7344-0256>

Сидоченко Никита Дмитриевич — студент Российского университета дружбы народов. Тел.: 8-495-952-89-01; e-mail: ssddnikita@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0451-8718>

Братковская Любовь Борисовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-18; e-mail: profkom-bio@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0511-7983>

Байжуманов Адиль Ануарович — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: adilbayzhumanov@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9737-4516>

Маторин Дмитрий Николаевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: dnmatorin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6164-5625>