

А.Б. Мырзабаев, К.М. Маханов, Д.К. Маханова

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова
(E-mail: makanov@inbox.ru)

Исследование процессов воздействия наночастиц серебра на фотобиологические свойства зеленого листа

В статье представлены результаты исследования спектральных характеристик зеленых листьев комнатных растений, «обогащенных» наночастицами серебра. Отмечено, что размеры наночастиц соответствовали 80 нм, форма — сферическая. Исследования спектров поглощения в диапазоне 350–650 нм показали, что наночастицы «встроились» в объеме зеленого листа. Анализ спектров поглощения, полученных при измерении раствора с наночастицами серебра, также подтвердил полученные результаты. Определено, что полученные данные могут способствовать пониманию фотопроцессов в биологических объектах. Практическая часть обусловлена возможностью создания биологических сенсоров и биодатчиков.

Ключевые слова: хлорофилл, наночастицы серебра, спектры поглощения, люминесценция, зеленые листья, биосенсоры, сорбция, абсорбция, флуоресценция, фосфоресценция, излучение, квант света, фотон.

Введение

Исследование фотопроцессов взаимодействия наночастиц, встроенных в различные природные структурные организации, является актуальной задачей. Интерес обусловлен возможностью их применения в таких устройствах, как биосенсоры, биодатчики и т.д.

Одним из наиболее эффективных методов, используемых при данных исследованиях, является люминесцентный. Использование данного метода обусловлено высокой чувствительностью, эффективностью и информативностью получаемых данных. К тому же это один из видов высокоэффективного бесконтактного исследования органических веществ.

В нашей работе рассмотрены процессы поглощения и фотосвечения зеленых листьев комнатных растений, предварительно «обогащенных» наночастицами серебра.

Следует отметить, что в ряде работ [1–3] авторы отмечают, что наночастицы серебра обладают наиболее высокими усилительными качествами и оптическими характеристиками по сравнению с частицами золота.

Целью данной работы является исследование фотобиологических процессов в зеленых листьях, предварительно «обогащенных» наночастицами серебра.

Известно, что хлорофилл — вещество, благодаря которому растения могут использовать солнечную энергию для синтеза органических веществ. Он способен не только поглощать свет, но и испускать его. Однако интенсивность подобного свечения очень слаба и не может быть применена на практике. Для достижения поставленной цели нами были запланированы и реализованы *следующие задачи*:

- разработан план проведения экспериментальных работ;
- проведен обзор литературных данных по исследуемой тематике;
- освоена техника исследования спектральных свойств, в частности СФ — 46 для измерения спектров поглощения;
- освоены основные методы синтеза наночастиц — метод Туркевича, боргидридный метод, биосинтез наночастиц;
- проведены спектрально-люминесцентные измерения.

Люминесценция возникает при преобразовании в свет энергии, поглощённой атомами, молекулами или ионами некоторых веществ. Далеко не все вещества способны давать люминесценцию. Частицы люминесцентного вещества, поглотив энергию, приходят в особое возбужденное состояние, которое длится некоторое, обычно очень незначительное, время, возвращаясь в исходное, нормальное состояние, возбуждённые частицы отдают избыток энергии в виде света — люминесценции. Необходимую для возбуждения свечения энергию можно сообщить частицам люминесцентного веще-

ства разными путями: можно направить на него поток световых лучей, можно достигнуть возбуждения частиц ударами электронов и т.д.

До последнего времени был известен один вид люминесценции растений — флуоресценция. Флуоресценция зелёных растений была открыта Стоксом. В настоящее время исследованию этого явления посвящено значительное количество работ [4, 5]. Установлено, что флуоресцирует хлорофилл листьев. Наиболее интенсивная полоса флуоресценции листьев обусловлена хлорофиллом *a* (рис. 1) и имеет максимум приблизительно при 682 нм; кроме того, обнаружены более слабая полоса с максимумом при 656 нм, обусловленная хлорофиллом *b*, и две слабые полосы от хлорофилла *a* с максимумом при 740 нм и 812 нм. Фрагмент, представленный на рисунке 1, был заимствован из <https://ru.wikipedia.org/wiki/Хлорофилл>.

Интенсивность флуоресцентного излучения живых листьев составляет приблизительно 0,1 % от количества поглощённого света; в растворах хлорофилла интенсивность флуоресценции в десятки раз больше. Основным стимулом к изучению флуоресценции было убеждение, что полученные данные могут дать прямые сведения о механизме использования световой энергии растениями при фотосинтезе.

Согласно работам [4, 5] имеются основания считать, что независимо от длины волны поглощаемого света возбуждённая молекула хлорофилла практически мгновенно переходит на более низкий энергетический уровень, соответствующий энергии «красного» кванта. Из этого состояния возможны различные пути превращения энергии возбуждения.

На основе полученных результатов авторы делают заключение, что наблюдаемое длительное послесвечение сопряжено, по крайней мере, с одной энзиматической химической реакцией и, следовательно, не может быть объяснено чисто физическими явлениями — замедленной флуоресценцией или фосфоресценцией.

Для объяснения полученных результатов авторы делают предположение, что и в общей цепи реакций фотосинтеза некоторые из ранних реакций обратимы, вплоть до высвечивания поглощённого кванта света.

Методика и технология измерений

Научный и прикладной интерес к наночастицам серебра изначально был связан с возможностью их применения в качестве высокодисперсной подложки для усиления сигнала молекул органических соединений в спектроскопии комбинационного рассеяния. Помимо этого, антибактериальные препараты на основе коллоидного серебра хорошо проявляли себя в медицине. В настоящее время известно большое количество традиционных методов получения наночастиц серебра [6].

В своей работе мы использовали наиболее простой метод получения наночастиц — так называемый метод «зеленой химии» [7]. Выбор данного метода обусловлен его простотой, доступностью, а также отсутствием токсичных воздействий. Данный метод сочетает в себе невысокую стоимость исходных материалов, биосовместимость, наличие природного реагента-восстановителя, поверхностно активных веществ, которые играют роль стабилизаторов и комплексообразователей — все это способствует получению «в одном флаконе» стабильных наночастиц серебра.

Исследование спектров поглощения осуществлялось на спектрофотометре СФ-46, который предназначен для измерения коэффициентов пропускания и поглощения жидких и твердых прозрачных веществ в области спектра от 190 до 1100 нм.

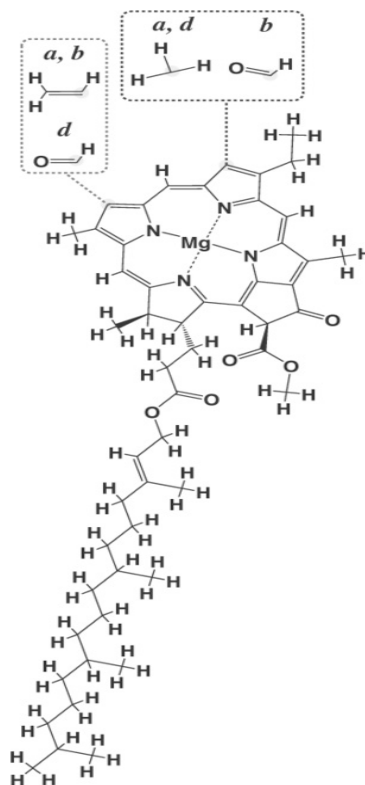


Рисунок 1. Химическая структура хлорофилла

Результаты и их обсуждение

В качестве объектов для исследований нами были использованы листья комнатного растения. Выбор того или иного растения осуществлен визуально. При этом учитывалось общепризнанное мнение, что наибольшую стойкость к воздействиям имеют те растения, для которых характерна избыточная «водянистость» листьев.

Первый пункт реализуемых задач был связан с решением следующего вопроса — измерение спектров поглощения зеленого листа. Данные необходимы для идентификации полос поглощения для планирования и реализации дальнейших работ, связанных с изучением фотолюминесценции.

Зеленый лист после внешнего осмотра подвергали очистке от пыли и других частиц путем промывки под проточной водой, а затем под струей дистиллированной воды. Затем данный лист с помощью медной ступки превращался в жидкую массу. Полученная масса процеживалась и, таким образом, раствор, необходимый для исследования спектров поглощения, был готов.

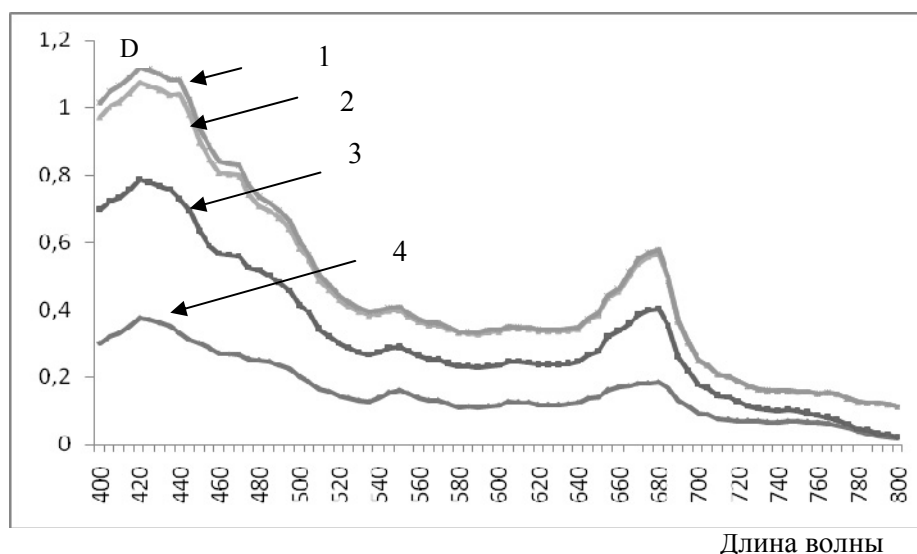


Рисунок 2. Спектры поглощения растворов зеленого листа при разных концентрациях хлорофилла

Для исключения процессов агрегации (образования сложных пар) мы изначально в отдельной емкости подготовили раствор слабой концентрации. Регистрация спектра поглощения показала (рис. 2, кривая 4), что спектр состоит из двух основных полос поглощения в фиолетовой (420 нм) и красной (680 нм) областях спектра.

Изменение концентрации раствора приводит к росту ширины полос поглощения. При этом наблюдаемые максимумы не смещаются (рис. 2, кривые 1–3). Полученные нами спектры поглощения совпали с результатами, имеющимися в других литературных источниках [6, 7], что подтверждает правильность наших измерений.

На рисунке 3 представлены фотографии подготовленных растворов при различных концентрациях хлорофилла. Все измерения проводились с использованием специальных кювет.

На следующем этапе экспериментальных работ на выбранный по визуальным наблюдениям лист мы «вживляли» наночастицы серебра. Сама по себе любая работа с живым листом оказалась довольно сложной задачей. Перед непосредственным выполнением данного этапа нами были проведены «температурные испытания» зеленых листьев. Было установлено, что нагрев листьев в водной среде по-разному влияет на листья разных видов. В некоторых случаях при выдержке в течение одного часа в сравнительно невысоких температурах (до 50 °С) листья в последующем теряли жизнеспособность. В ряде случаев наблюдается устойчивость, вплоть до 90–100 °С. Зеленые листья выбранного нами растения сохраняли жизнеспособность при нагреве до 50 °С.

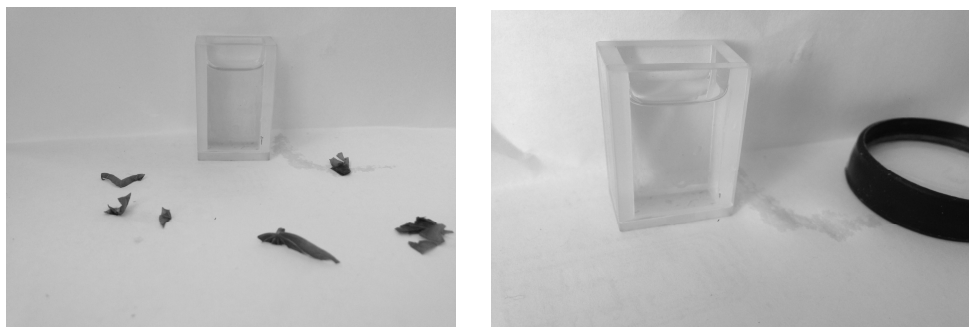


Рисунок 3. Приготовленные растворы при разных концентрациях хлорофилла

Следует вкратце пояснить суть и необходимость нагрева листьев. Дело в том, что мы предполагали, что подобно человеческой коже нагрев приведет к расширению пор зеленого листа. При этом, если сам лист будет расположен в растворе с наночастицами серебра (порядка 80 нанометров), то существует вероятность того, что частицы «проникнут» в образовавшиеся поры и останутся там. В последующем ожидалось, что слабое люминесцентное излучение самих листьев может быть усилено наночастицами серебра.

Таким образом, температурный нагрев листьев показал, что жизнеспособность сохраняется при нагреве до 50°C .

Процедуру «вживления» наночастиц серебра осуществляли в следующем порядке. Предварительно заготовили емкость, размеры которой позволяли установить внутри емкость с раствором наночастиц серебра. Также данная емкость имела сливной кран на дне. Зеленый лист опускался в раствор с наночастицами серебра. Контроль за температурой осуществляли с помощью лабораторного термометра. Температура жидкости в наружной емкости поддерживалась близкой к $+50^{\circ}\text{C}$. При этом, естественно, что и раствор с наночастицами и сам зеленый лист тоже прогревались до $+50^{\circ}\text{C}$.

По завершении данного этапа работ нерешенным оставался вопрос об эффективности использованного нами метода «обогащения» зеленого листа, т.е. какая часть в процентном соотношении «внедрилась» в клетки листа и осталась на ее поверхности.

Для проверки данного вопроса «обработанный» лист был предварительно высушен в течение 8 часов, а затем подвергнут обработке в медной ступке. Сушка зеленого листа была необходима для того, чтобы зеленая масса не влияла на результаты эксперимента. Измельченный лист разбавили в 0,02 л дистиллированной воды. Затем дополнительно процедили сквозь сито и провели визуальный осмотр. Невооруженным глазом было видно, что раствор приобрел более мутный вид, выдержка под солнечными лучами показала наличие слабого свечения. Однако это могло быть связано и с рассеянием солнечных лучей.

Окончательный ответ был получен путем измерения спектров поглощения подготовленного раствора. Измерение спектров поглощения было проведено в диапазоне 350–650 нм. Полученный спектр представлен на рисунке 4 (кривая 1).

Из рисунка видно, что спектр состоит из полос поглощения в области 420–430 нанометров и, как мы полагаем, они принадлежат наночастицам серебра. Сравнение с литературными данными подтвердило истинность полученных результатов. Наблюдаемый результат также подтвердил наше предположение о возможности «вживления» наночастиц в клетки зеленых растений. В сравнении с оптической плотностью исходного раствора (кривая 2) оптическая плотность поглощения частиц серебра уменьшилась более чем в два раза, о чем и свидетельствуют данные графики. Единственно возможное объяснение данного результата может быть связано с предположением, что в процессе «паровой» обработки наружные поры зеленого листка расширились, что позволило частицам «проникнуть» и «закрепиться» в порах.

Однако судить об абсолютной верности данного метода без последующих исследований, с применением возможностей электронной микроскопии и без тщательных измерений люминесцентного излучения на данный момент еще рано.

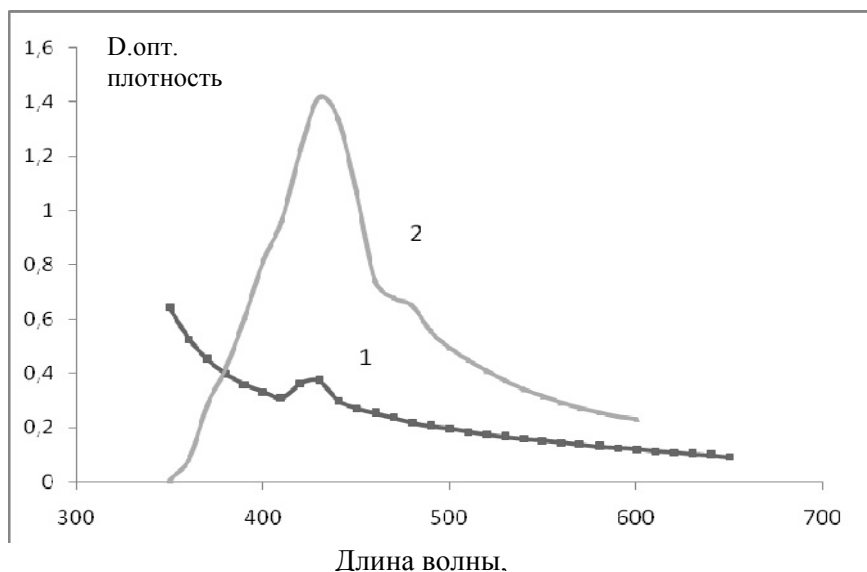


Рисунок 4. Спектр поглощения наночастиц серебра после повторного растворения (1) в исходном растворе и до «обогащения» листа (2)

Заключение

На основе полученных результатов мы можем предварительно утверждать, что использованный в работе метод «обогащения» наночастицами серебра зеленых листьев может быть использован при выполнении подобных работ. Предполагается, что наночастицы серебра «встраиваются» в расширившиеся поры клеток. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при измерении спектров поглощения (рис. 4, кривая 1).

Список литературы

- 1 Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L. Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes // Science. — 2000. — Vol. 289. — P. 1757.
- 2 Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection // Science. — 2002. — Vol. 297. — P. 1536–1540.
- 3 Zhang J., Malicka J., Gryczynski I., Lakowicz J.R. Single Cell Fluorescence Imaging Using Metal Plasmon-Coupled Probe // The Journal of Physical Chemistry B. — 2005. — Vol. 109. — P. 7643.
- 4 Москвин А.В. Католюминесценция. — М.: Просвещение, 1949. — 300 с.
- 5 Принсгейм П.П. Флюоресценция и фосфоресценция / П.П.Принсгейм. — Л.: Владос, 1951. — 214 с.
- 6 Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии. — 2008. — Т. 77 (3).
- 7 Гордиенко Н., Касимова Ж., Мусабаева Б. Получение наночастиц серебра методами «зеленой химии». — Саарбрюккен: LAP Lambert Academic Publishing, 2014. — 52 с.

А.Б. Мырзабаев, К.М. Маханов, Д.К. Маханова

Жасыл жапырақтың фотобиологиялық қасиеттеріне күміс нанобөлшектерінің әсерлесу процестерін зерттеу

Мақалада күміс нанобөлшектерімен «байытылған» бөлмеде өсетін өсімдіктердің жасыл жапырақтарының спектрлік сипаттамаларын зерттеу нәтижелері келтірілген. Нанобөлшектердің өлшемдері 80 нм сәйкес келеді, ал пішіні бойынша олар сфера тәрізді. Жұтылу спектрлеріне 350–650 нм диапазонында жүргізілген зерттеу жұмыстары нанобөлшектердің жасыл жапырақ көлеміне «енгенін» көрсетті. Күміс нанобөлшектері енгізілген ерітіндісіне жүргізілген жұтылу спектрлеріне жүргізілген талдау алынған нәтижелерді дәлелдеді. Бұл мәліметтер биологиялық объектілердегі фотопрцестерді тереңірек түсінуге үлес қосады. Практикалық жағынан жұмыс нәтижелері биологиялық сенсорлармен биосезгіштерді жасауға қолданылуы мүмкін.

A.B. Myrzabaev, K.M. Makhanov, D.K. Makhanova

Process Research interaction silver nanoparticles on photo-biological properties of green plant leaves

This paper presents the results of a study of the spectral characteristics of the green leaves of houseplants, «enriched» with silver nanoparticles. The dimensions of nanoparticles corresponded to 80 nm, the shape — spherical. Studies of the absorption spectra in the range of 350–650 nm showed that the nanoparticles are «embedded» in the amount of green leaf. Analysis of the absorption spectra obtained from measurements with silver nanoparticles solution, also confirmed the results. The findings may contribute to understanding Photoprocesses in biological objects. The practical part is due to the ability to create biological sensors and biosensors.

References

- 1 Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L. *Science*, 2000, 289, p. 1757.
- 2 Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A. *Science*, 2002, 297, p. 1536–1540.
- 3 Zhang J., Malicka J., Gryczynski I., Lakowicz J.R. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109, p. 7643.
- 4 Moskvina A.V. *Cathodoluminescence*, Moscow: Prosveshchenie, 1949, 300 p.
- 5 Pringsheim P.R. *Fluorescence and fosforentsentsiya*, Leningrad: Vldos, 1951, 214 p.
- 6 Krutyakov Y.A., Kudrinsky A.A., Olenin A.Y., Lisichkin G.V. *Chemical Reviews*, 2008, 77 (3).
- 7 Gordienko N., Kasymova G., Musabaeva B. *Preparation of silver nanoparticles means «green chemistry»*, Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2014, 52 p.