

Т.В. ПАРШИКОВА, **О.В. БРАЙОН**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, Київ, 01017, Україна

**ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН НА ФОТОВИЦВІТАННЯ
ХЛОРОФІЛУ *A* У *MICROCYSTIS
AERUGINOSA* KUETZ. em. ELENK
ТА *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER**

Ключові слова: фотовицвітання хлорофілів, одноклітинні водорості, поверхнево-активні речовини.

Фотодеструкція зелених пігментів рослин у природних умовах відбувається під впливом різноманітних біотичних та абіотичних факторів [1, 11]. Найважливішими з останніх є інтенсивність освітлення і спектральний склад світла [3]. В останні роки фотовицвітання водоростей та хлорофілмісних бактерій привернуло увагу фахівців у зв'язку з аномаліями клімату, обумовленими як нестабільністю метеорологічних умов, так і впливом УФ-радіації та активності Сонця. Вплив УФ-променів (280–365 нм) як чинника фотодеструкції пігментів і зв'язаних з ними структур (зокрема, бактеріохлорофілу, хлорофілу *a*, світлозбираючих комплексів і реакційних центрів) досліджували в різних аспектах [3, 5, 12].

Встановлено [9], що під впливом УФ 280 нм відбувається селективна деструкція довгохвильової форми (800 нм) бактеріохлорофілу *a* та зменшується його фотохімічна активність. Під впливом УФ 365 нм спостерігається деструкція обох довгохвильових форм хлорофілу (800 і 865 нм). Відомо [10], що реакція пігментних систем нативних клітин водоростей передусім залежить від довжини УФ-хвилі, інтенсивності і тривалості освітлення, оскільки при цьому збільшується поверхневий потенціал тилакоїдних мембран. Не менш важливими є спектральні особливості й функціональна роль I та II фотосистем клітин, їх хлорофілів-акцепторів, інших фоточутливих пігментів, а також наявність активних форм кисню, що генеруються реакційними центрами. Температура, при якій відбувається процес фотодеструкції, має значний вплив на кількість та фізичний стан обводненості клітинних структур. Останні визначають фотосинтетичну активність організмів, рівень процесів трансформації фосфору як джерела макроергічних зв'язків в енергетиці клітин.

Нашою метою було вивчення характеру пошкодження фотосинтетичного апарату клітин представників прокаріотичних і еукаріотичних водоростей за швидкістю фотовицвітання хлорофілів.

© Т.В. ПАРШИКОВА, **О.В. БРАЙОН**, 2004

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проводили з *Microcystis aeruginosa* Kuetz. em. Elenk (Cyanophyta (Cyanobacteria)) та *Chlorella vulgaris* Beijer. (Chlorophyta). Водорості одержували з колекції Інституту гідробіології НАН України (HPDP). Культури водоростей вирощували на селективних живильних середовищах при температурі $20 \pm 2^\circ\text{C}$ та інтенсивності освітлення $6,6\text{--}7,4 \text{ Вт/м}^2$ (тривалість освітлення й темряви — 12/12 год). Для *Microcystis aeruginosa* використовували середовище Фітцджеральда № 11, для *Chlorella vulgaris* — середовище Тамія [6]. Для дослідів брали культуру на стаціонарній фазі росту.

Як фактор впливу використовували катіоактивну поверхнево-активну речовину (КПАР) катамін (алкїлдіметїлбензіламонїї хлорид, SIGMA, США) у концентраціях 0,1; 1,0 і 3 мг/л. Критерієм вибору КПАР як діючого реагенту були обсяги його використання на практиці, а також рівні фактичного вмісту у природних водах. Контролем були нативні клітини водоростей, які не контактували з катаміном і розвивались на чистому від нього середовищі.

Фотовицвітання водоростей оцінювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2, використовуючи варіант прохідного крізь об'єктив світла, відфільтрованого зі спектра лампи ДРШ-250 світлофільтром ФС-1 ($I_{\text{max}} = 430 \text{ нм}$). Інтенсивність діючого світла на вході становила до 100 Вт/м^2 . Перед початком дослідів в полі зору мікроскопа клітини водоростей мали яскраво-червоний колір внаслідок збудження інтенсивності флуоресценції хлорофілу *a*. За допомогою секундоміра визначали час (у хвилинах), за який червоне забарвлення поступово зникало. Для визначення кількісних показників пігментного комплексу водоростей застосовували метод диференціальної флюорометрії з використанням Plectrofluogometer FL 300 3M розробки Красноярського університету (Росія) [4, 5]. Паралельно визначали DF (різницю інтенсивності флуоресценції до і після внесення симазину як інгібітора електронного транспорту фотосинтезуючих клітин). Цей показник характеризував рівень життєздатності клітин, а також величину їх потенційної фотосинтетичної активності. Вихідна концентрація хлорофілу *a* для *Microcystis aeruginosa* становила 580,3, для *Chlorella vulgaris* — 497,4 мкг/л.

Кількість хлорофілу *a* при фотовицвітанні за 1 хв, наведену в таблиці, ми обчислювали відносно його вмісту у вихідному контролі. Враховуючи, що змінювався не лише час фотовицвітання, а й сама кількість хлорофілу *a*, для розрахунку втрат хлорофілу *a* за 1 хв ми брали його кількість у вихідному контролі. В контролі та дослідних варіантах її визначали методом диференціальної флюорометрії до і відразу після додавання катаміну, а також через відповідні проміжки часу контакту з ним клітин.

Математичну обробку одержаних результатів здійснювали з використанням методів статистичного аналізу [8]. Висновки робили за допомогою критерію Стьюдента за довірчої ймовірності $P = 0,95$.

Результати досліджень та їх обговорення

Як засвідчують проведені експерименти, у полі зору люмінесцентного мікроскопа живі клітини *Chlorella* та *Microcystis* інтенсивно флуоресціювали яскраво червоним кольором. Під дією катаміну клітини обох видів через певний проміжок часу втрачали здатність до флуоресценції й спочатку ставали жовтими, а потім зовсім знебарвлювались. Як видно з рис. 1, реакції на фоточищення клітин водоростей з різними пігментними комплексами (*Chlorella* — хлорофіли *a + b*, *Microcystis* — хлорофіл *a* + фікоціанін С + алофікоціанін) суттєво відрізнялись. Катамін у концентрації 0,1–3,0 мг/л протягом 3 год контакту прискорював фоточищення клітин *Chlorella*, однак хлорофіл стабільно зберігався навіть при концентрації 3 мг/л. У *Microcystis* стабільність вмісту хлорофілу *a* спостерігалась лише при концентрації 0,1–1,0 мг/л. Найшвидше хлорофіли вищивали при концентрації катаміну 3 мг/л.

Чіткіша концентраційна залежність фоточищення пігментів виявлена для *Microcystis*. Проте зауважимо, що клітини *Chlorella* фоточищували до знебарвлення протягом 1,45–2,07 хв, а в синьозеленої водорості фоточищення хлорофілу *a* відбувалось від 1,9 до 5,6 хв.

Як відомо, у *Cyanophyta* відсутні структуровані пластиди, а ламелярні структури із хлорофілом розміщені у хроматоплазмі. Однак це не завадило синьозеленим водоростям не лише першими заселити різні біотопи нашої планети [7], а й досить непогано розвиватись в наш час і у водній сфері, і в ґрунтах [2].

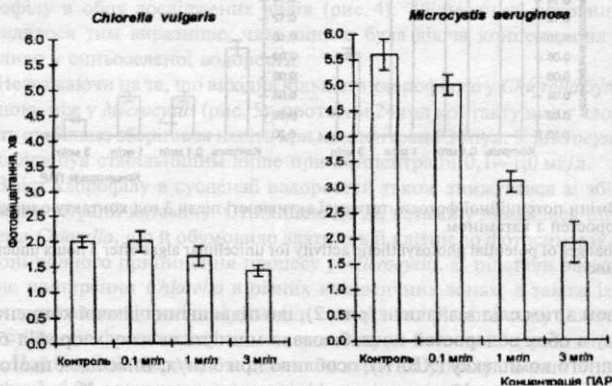


Рис. 1. Швидкість фоточищення хлорофілу *a* в одноклітинних водоростях після 3 год контакту з катаміном

Fig. 1. Speed of photofading of chlorophyll *a* for unicellular algae after 3 hours under effect of catamine

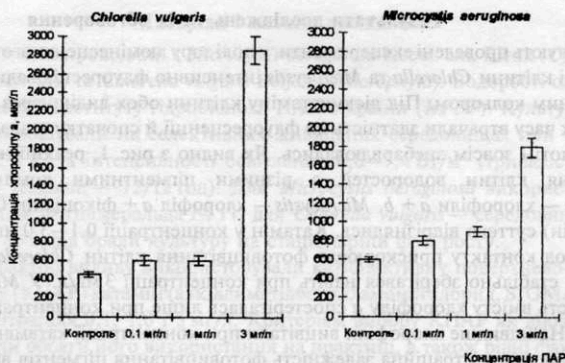


Рис. 2. Зміни концентрації хлорофілу *a* після 3 год контакту одноклітинних водоростей з катаміном

Fig. 2. Changes of chlorophyll *a* concentration for unicellular algae after 3 hours under effect of catamine

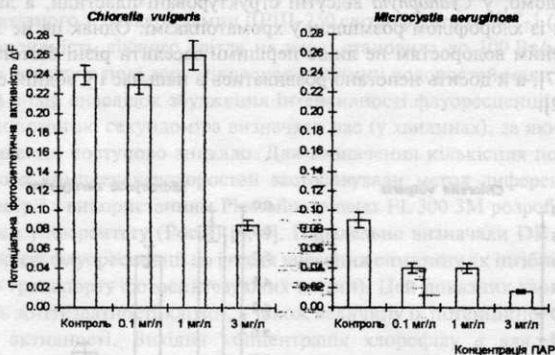


Рис. 3. Зміни потенційної фотосинтетичної активності після 3 год контакту одноклітинних водоростей з катаміном

Fig. 3. Changes of potential photosynthetic activity for unicellular algae after 3 hours under effect of catamine

Разом з тим слід зазначити (рис. 2), що підвищення діючої концентрації катаміну в обох водоростей послаблювало міцність зв'язку хлорофіл-білково-ліпідного комплексу (ХБЛК), особливо при 3 мг/л. Внаслідок цього концентрація неміцно зв'язаного хлорофілу по відношенню до його вихідного вмісту у *Chlorella* збільшувалась за 3 год майже у 6 разів, а у *Microcystis* — лише у 3. Проте у *Chlorella* ХБЛК був стабільнішим й руйнувався лише у разі контакту з катаміном при концентрації 3 мг/л.

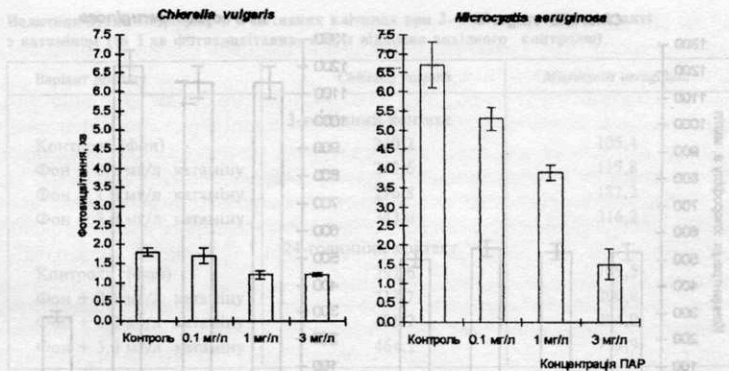


Рис. 4. Швидкість фотовицвітання хлорофілу *a* після 24 год контакту одноклітинних водоростей з катаміном

Fig. 4. Speed of chlorophyll *a* photofading for unicellular algae after 24 hours under effect of catamine

Порівняльна оцінка рівня потенційної фотосинтетичної активності водоростей в умовах впливу катаміну (рис. 3) засвідчила, що *Chlorella*, маючи досконалішу фотосистему, зберігала й вищий рівень фотосинтетичної активності, ніж *Microcystis*.

Контакт клітин з катаміном до 24 год змінив динаміку фотовицвітання хлорофілу в обох досліджених видів (рис. 4). Збільшення фотовицвітання проявлялося тим виразніше, чим вищою була діюча концентрація КАР, особливо у синьоzielеної водорості.

Незважаючи на те, що вихідна кількість хлорофілу *a* у *Chlorella* була удвічі меншою, ніж у *Microcystis* (рис. 5), протягом 24 год контакту вміст хлорофілів досить стабільно зберігався навіть при концентрації 3 мг/л. У *Microcystis* вміст хлорофілу був стабільнішим лише при концентрації 0,1–1,0 мг/л.

Вміст хлорофілу в суспензії водоростей також знижувався зі збільшенням концентрації катаміну. Стійкішою до дії катаміну виявилася пігментна система *Chlorella*, що й обумовило здатність її клітин до фотосинтезу (рис. 6) на фоні повного припинення процесу у *Microcystis*. Є підстави вважати, що значне поширення *Chlorella* в різних кліматичних зонах, а також їх виживання в системах біологічної очистки стічних вод різного типу можна пояснити стійкістю фотосинтезуючого комплексу до впливу несприятливих факторів. Цей факт підтверджують величини втрат хлорофілу *a* в нативних клітинах при 3- і 24-годинному контакті з катаміном (таблиця).

Підсумовуючи результати дослідження фотовицвітання пігментних систем на прикладі клітин прокаріотичних та еукаріотичних мікрободоростей можна зазначити, що це складна багатфункціональна реакція на світлове

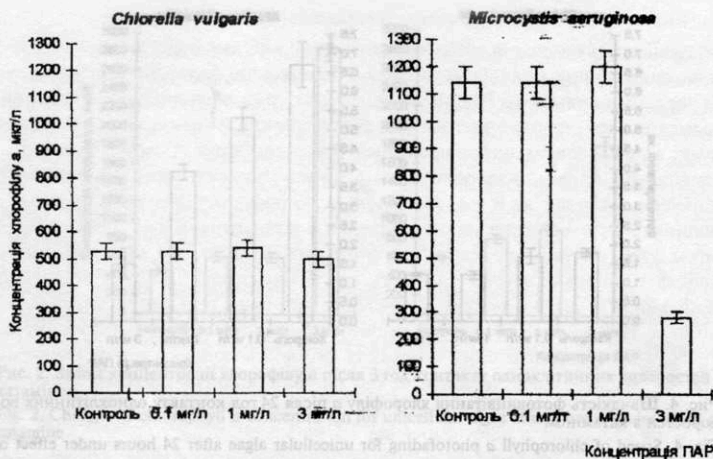


Рис. 5. Зміни концентрації хлорофілу *a* після 24 год контакту водоростей з катаміном
 Fig. 5. Changes of chlorophyll *a* concentration for algae after 24 hours under effect of catamine

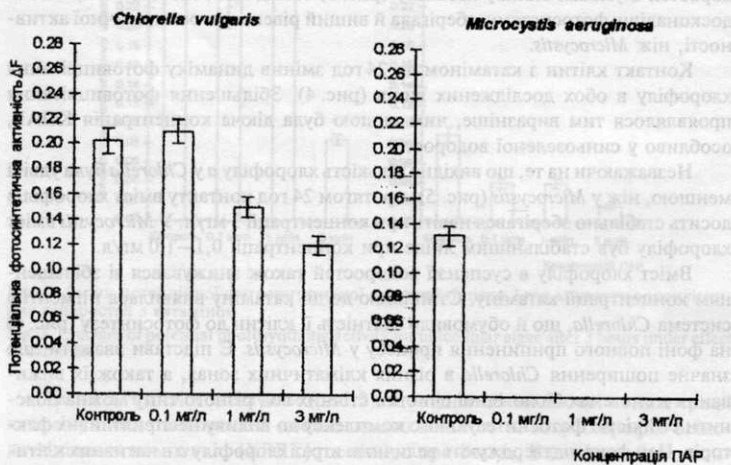


Рис. 6. Зміни потенціальної фотосинтетичної активності після 24 год контакту одноклітинних водоростей з катаміном
 Fig. 6. Changes of potential photosynthetic activity for unicellular algae after 24 hours under effect of catamine

Величина втрат хлорофілу *a* в нативних клітинах при 3- і 24-годинному контакті з катаміном (за 1 хв фотовицвітання, мкг/л відносно вихідного контролю)

Варіант досліджу	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	3-годинний контакт	
Контроль (фон)	240,2	105,4
Фон + 0,1 мг/л катаміну	242,6	119,8
Фон + 1,0 мг/л катаміну	276,8	187,2
Фон + 3,0 мг/л катаміну	343,0	316,2
	24-годинний контакт	
Контроль (фон)	291,6	169,5
Фон + 0,1 мг/л катаміну	317,7	200,8
Фон + 1,0 мг/л катаміну	485,2	294,0
Фон + 3,0 мг/л катаміну	464,1	739,9

збудження хлорофілу і функціонування багатьох метаболічних ланцюгів клітини. Передусім це стосується міцності зв'язку ХБЛК як передумови нормальної роботи хлорофілів під час фотосинтезу.

Як засвідчують одержані дані, у рослинних клітинах різного систематичного положення у процесі еволюції сформувався ряд структурних і функціональних захисних пристосувань, які допомагають їм виживати в мінливих і далеко не завжди сприятливих умовах довкілля.

Зменшення міцності зв'язку ХБЛК клітини в умовах високого рівня освітлення можна розглядати як пристосування до виживання. Звільнений з комплексу хлорофіл за рахунок збудження сильніше флуоресцює, випромінюючи частину енергії, яка б могла зніщувати низку негативних процесів, зокрема надмірне перезбудження хлорофілу і внаслідок цього — посилення фотолізу води, нагромадження у клітинах зайвого кисню, виникнення вільнорадикальних процесів й посилення перекисного окиснення ліпідів та інших компонентів клітини. Шкідливість цих процесів для життєдіяльності клітин є значно більшою, ніж викид назовні зайвої енергії збудженого світлом хлорофілу.

Висновки

1. Експериментально встановлено, що використати інформативність процесу фотовицвітання з діагностичною метою та для біотестування у одноклітинних водоростей досить складно. У зв'язку з цим розшифровка причин пошкодження світлом фотосинтетичного апарату потребує паралельного контролю й інших функціональних показників.

2. Найвагомимим з додаткових функціональних показників може бути міцність ХБЛК та збереження здатності хлорофілвмісної клітини до фотосинтетичної активності. Саме інформація про збереження здатності живої клітини до фотосинтезу може допомогти визначенню тієї межі, за якою відбуваються необоротні зміни функціональної активності й відмирання біосистеми під впливом того чи іншого фактора.

3. Під дією однакових концентрацій катаміну, в тім числі й максимальної з досліджених — 3 мг/л, клітини *Chlorella* зберігали вищий рівень фотосинтетичної активності, ніж *Microcystis*.

4. Величини втрат хлорофілу *a* нативними клітинами еукаріотичної водорості при 3- і 24-годинному контакті з катаміном порівняно з прокаріотичною одноклітинною водорістю були також меншими, що засвідчило більшу стійкість фотосинтетичного апарату *Chlorella*.

5. Оцінка особливостей фотовищівання хлорофілів перспективна для вивчення ступеня пошкодження фотосинтетичного апарату клітин та експрес-визначення негативної дії різних забруднювачів довкілля на життєдіяльність організмів.

6. Застосований експрес-метод неруйнівного контролю функціонального стану мікроводоростей можна рекомендувати для використання при біотестуванні ступеня токсичності водного середовища на альгологічних об'єктах.

Робота частково виконана за підтримки гранту Міністерства освіти та науки України № 06.07/82.

1. Браїон О.В. Флуоресцентна мікроскопія рослинних тканин і клітин. — К.: Вища шк., 1973. — 142 с.
2. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, концепт флори) / І.Ю.Костіков, П.О.Романенко, Е.М.Демченко та ін. — К.: Київ. нац. ун-т імені Тараса Шевченка, 2001. — 300 с.
3. Геворгіс Р.Г. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Нестационарный процесс // Альгология. — 1998. — № 1. — С. 69—74.
4. Гольд В.М., Гаевский Н.А., Григорьев Ю.С. и др. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла. — Красноярск: Краснояр. гос. ун-т, 1984. — 84 с.
5. Гольд В.М., Шатров И.Ю., Попельницкий В.А. и др. Ассимиляционная зависимость хлорофилла (теоретические и методические аспекты) // Биол. внутр. вод. — 1996. — № 1. — С. 24—32.
6. Каталог культур микроводорослей в коллекции СССР / Под ред. В.Е.Семенов, М.Г.Владимировой. — М.: Ин-т физиол. раст. им. К.А.Тимирязева РАН, 1991. — 226 с.
7. Кондратьева Н.В. Морфогенез и основные пути эволюции гормонониевых водорослей. — Киев: Наук. думка, 1975. — 302 с.
8. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. — Киев: МОРИОН, 2000. — 320 с.
9. Соловьев Л.А., Ерохин Ю.Е. Устойчивость фотосинтетического аппарата пурпурных бактерий к действию УФ // Тр. II съезда биофизиков России: Тез. докл. — М., 1999. — С. 1076—1077.
10. Халилов Р.И., Хомутов Г.Б., Тихонов А.Н. Влияние УФ-излучения на структурно-функциональные характеристики тилакоидной мембраны // Физиология растений. — 1993. — 40, № 3. — С. 373—378.
11. Bolhar-Nordenkamp H.R., Long S.P., Baker N.R. et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation // Functional Ecology. — 1989. — N 3. — P. 497—514.
12. Nielsen M.V. Irradiance and daylength effects on growth and chemical composition of *Gyrodinium aureolum* Hulburt in culture // J. Plankton Res. — 1992. — 14, N 6. — P. 811—820.

Рекомендує до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 23.03.2004

Т.В. Паршикова, А.В. Брайон

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
НА ФОТОВЫЦВЕТАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА А У *MICROCYSTIS*
AERUGINOSA KUETZ. em. ELENK И *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER.

Экспериментально показано, что модифицированный люминесцентно-микроскопический анализ скорости фотовыцветания хлорофилла *a* следует отнести к перспективному экспресс-методом неразрушающего контроля физиологического состояния микроскопических водорослей. Обсуждаются особенности фотовыцветания у одноклеточных представителей прокариотических и эукариотических водорослей под действием катионного поверхностно-активного вещества (катамина). Установлено, что при одинаковых концентрациях катамина клетки *Chlorella* сохраняют более высокий уровень фотосинтетической активности, чем *Microcystis*. Величины потери хлорофилла *a* при фотовыцветании в нативных клетках эукариотической водоросли по сравнению с прокариотической при 3–24-часовом контакте с ПАВ также ниже. Это свидетельствует о более высокой устойчивости к свету фотосинтетического аппарата зеленой водоросли как эволюционно более молодого организма.

Т. В. Parshikova, A. V. Brayon

Taras Shevchenko Kiev National University

THE CHLOROPHYLL A PHOTOPHANDING IN *MICROCYSTIS*
AERUGINOSA KUETZ. em. ELENK. AND *CHLORELLA VULGARIS*
BEIJER UNDER PRESENCE OF SURFACTANTS

Experimental data testifies that modified luminescence-microscopic analysis of speed of chlorophyll *a* photofading may be the perspective express-methods of nondestructive control of physiological state of microalgae. It was discussed the peculiarities of speed of chlorophyll *a* photofading for monocellular procariotic and eucariotic algae under effect of cationic surfactant (catamine). It was established that *Chlorella* cells keep higher level of photosynthetic activity then *Microcystis* under similar concentration of catamine. Values of chlorophyll *a* losses in photofading of native eucariotic algae cells in connection with procariotic under 3–24 hours of contact with surfactant were little. It testifies about higher stability to light of photosynthetic apparatus of green algae as more evolutionally young organism.