

А. Ф. Попова, Г. Ф. Иваненко

Эффекты различных концентраций неионогенных ПАВ на ультраструктуру клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

(Представлено академиком НАН Украины К. М. Сытником)

*Наведено дані про широкий спектр ультраструктурних перебудов компартментів клітин *Chlamydomonas reinhardtii* під впливом різних концентрацій неионогенних поверхнево-активних речовин (ПАВ), зокрема оксиетилового ефіру поліетиленгліколю. Показано, що неионогенні ПАВ викликають перш за все ультраструктурні перебудови ядер, часто несумісні з нормальним їх функціонуванням. Встановлено чітку залежність ступеня ультраструктурних змін клітинних компартментів від концентрації ПАВ і тривалості їх дії на клітини водоростей, що відкриває можливості використання цитологічного аналізу для оцінки впливу хімічних забруднювачів на стан клітин планктонних водоростей.*

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) разных классов наряду с другими химическими веществами вносят существенный вклад в общий уровень антропогенных загрязнений. Причем в результате широкого использования ПАВ в быту и в разных отраслях промышленности, а также не применения методов их детоксикации в очистных сооружениях ПАВ в значительных количествах попадают в естественные водоемы вместе со сточными водами [1], достигая нередко концентрации 5,0–5,2 мг/л [2], что представляет существенную опасность для водных организмов.

В настоящей работе анализируются эффекты неионогенных ПАВ, закономерности влияния которых на структуру и метаболизм клеток водных организмов не изучены, в противоположность таковым других классов ПАВ [3–6]. Хотя благодаря вариабельности их оснований и степени оксиэтилирования [7] неионогенные ПАВ считаются менее токсичными по сравнению с анион- и катионактивными.

Основной целью проведенного нами исследования было изучение эффектов неионогенных ПАВ на ультраструктуру клеток планктонных водорослей в зависимости от уровня их концентрации и длительности воздействия. При этом применялся цитологический анализ, который дает возможность изучить структурные перестройки клеточных компартментов и оценить взаимосвязь структурных и функциональных изменений клеток водорослей под действием различных концентраций неионогенных ПАВ.

В работе использовали модельные эксперименты с тест-культурой, хорошо изученной в лабораторных условиях одноклеточной зеленой водорослью *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. ввиду невозможности идентификации действия ПАВ в естественных водоемах на фоне комплексного антропологического загрязнения. В модельных экспериментах изучали действие оксиетилового эфира полиетиленгликоля (со степенью оксиметилирования 20) [(C₈P₁₇-0(CH₂-CH₂O)₂₀)], относящегося к классу неионогенных ПАВ. Тестировали довольно широкий диапазон концентраций — от 0,1 до 10,0 мг/л, как и в предыдущих экспериментах с ПАВ других классов [8], с целью проведения сравнительного анализа. Продолжи-

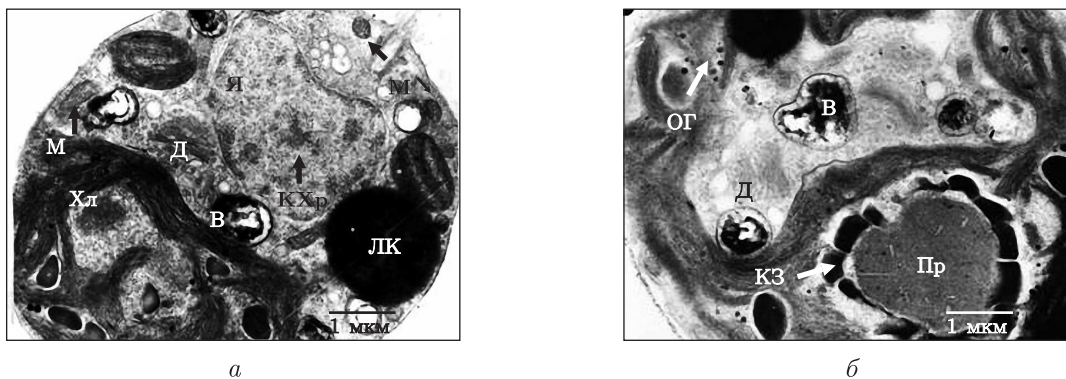


Рис. 1. Фрагменты клеток *Ch. reinhardtii*, контроль (а, б). Условные обозначения: Хл — хлоропласт, КЗ — крахмальное зерно, Пр — пиреноид, ЛК — липидная капля, М — митохондрия, Д — диктиосома, В — вакуоль, ОГ — осмиофильная глобула, Я — ядро, КХр — конденсированный хроматин

тельность экспериментов составляла 3–72 ч. Повторность опытов трехкратная. Ультратонкие срезы клеток *Ch. reinhardtii*, фиксированных согласно предварительно разработанной методике [6], исследовали и фотографировали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-130 EX (JEOL, Япония).

Ультраструктура клеток *Ch. reinhardtii* в условиях стационарного контроля была типичной для одноклеточных зеленых водорослей (рис. 1, а). Ядро клетки *Ch. reinhardtii* ахроматического типа содержало, как правило, одно ядрышко. Чашевидной формы хлоропласт имел 1–2 пиреноида, окруженные амилогенной обкладкой, состоящей из крахмальных зерен (см. рис. 1, б). Мембранная система хлоропласта представлена пучками тилакоидов, не сгруппированных в граны. В строме хлоропласта имелись многочисленные зерна крахмала, а также отдельные осмиофильные глобулы размером 20–30 нм (см. рис. 1, б). В цитоплазме клеток апикальной зоны локализованы митохондрии небольшого размера (до 0,3 мкм), аппарат Гольджи из 4–6 диктиосом и небольшого размера вакуоли (см. рис. 1, а, б).

Низкие концентрации оксиэтилового эфира полиэтиленгликоля (0,1–1,0 мг/л) в течение кратковременного действия (1 сут) существенно не влияли на ультраструктуру клеток *Ch. reinhardtii*, хотя во многих ядрах отмечали незначительные расширения перинуклеарного пространства. Нередко формировались значительные выпячивания внешней ядерной мембраны, при этом ширина перинуклеарного пространства в таких зонах составляла до 0,7–1,0 мкм (рис. 2, а, указано стрелкой). В строме хлоропластов наблюдали лишь незначительные расширения интратилакоидного пространства и мелкие осмиофильные глобулы.

Воздействие ПАВ этих же концентраций в течение 3 сут усиливало изменения в структуре ядер, вызывая “везикуляцию” ядерной оболочки вследствие расширения перинуклеарного пространства между густо расположенными порами и даже дезинтеграцию ядерной оболочки на значительном ее протяжении (см. рис. 2, б).

При увеличении срока действия (5 сут) оксиэтилового эфира полиэтиленгликоля этих же концентраций расширения перинуклеарного пространства наблюдали во множестве клеток *Ch. reinhardtii*, причем их размер достигал иногда до 1/3 объема ядра. В отдельных клетках популяции ядра содержали увеличенное количество гетерохроматина, локализованного обычно вдоль ядерной оболочки. В хлоропластах формировались более крупные (50–200 нм) осмиофильные глобулы по сравнению с контролем.

С повышением концентрации детергента (3,0 мг/л) и удлинением срока его контакта с клетками культуры водоросли (до 5 сут) изменения ультраструктуры различных клеточ-

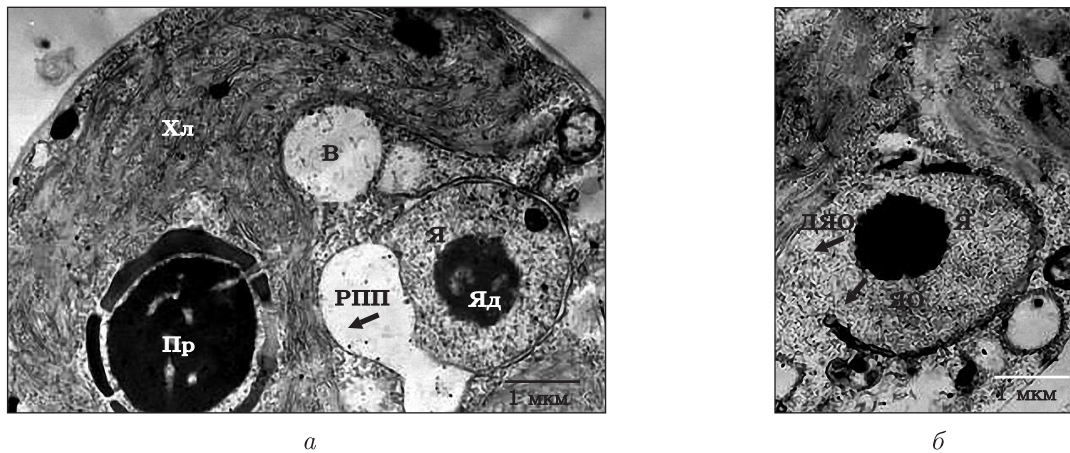


Рис. 2. Фрагменты клеток *Ch. reinhardtii* с хлоропластом и ядрами при действии 1,0 мг/л оксигетилового эфира полиэтиленгликоля: *а* – 1 сут; *б* – 3 сут. Условные обозначения: Я – ядро, Яд – ядрышко, РПП – расширение перинуклеарного пространства, ЯО – ядерная оболочка, ДЯО – дезинтеграция ядерной оболочки, Хл – хлоропласт, В – вакуоль, Пр – пиреноид

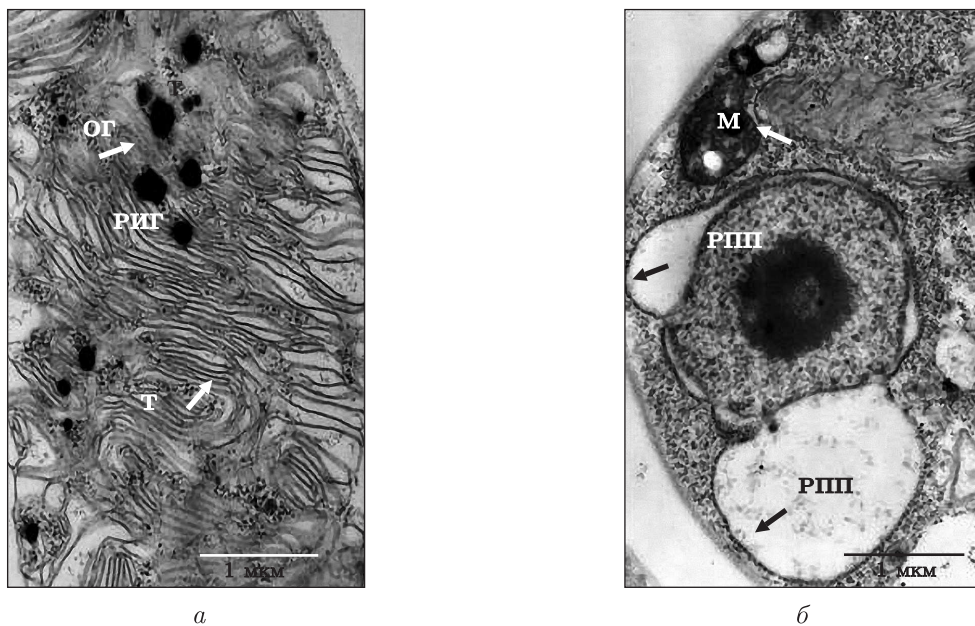


Рис. 3. Фрагменты клеток *Ch. reinhardtii* с хлоропластом (*а*) и ядром (*б*) при действии оксигетилового эфира полиэтиленгликоля в концентрации 3,0 мг/л (*а*), 5,0 мг/л (*б*) в течение 5 сут. Условные обозначения: Т – тилакоид, РИГ – расширение интратилакоидного пространства, ОГ – осмиофильная глобула, РПП – расширение перинуклеарного пространства, М – митохондрия

ных компартментов существенно усиливались. Это касалось прежде всего хлоропластов. В частности, пучки тилакоидов полностью отсутствовали и топография тилакоидов становилась неупорядоченной, причем выявлялись значительные расширения интратилакоидного пространства (рис. 3, *а*). Количество и размер осмиофильных глобул в строме хлоропластов увеличивались (см. рис. 3, *а*). Ядра клеток, как правило, приобретали многочисленные расширения перинуклеарного пространства, а профили внешней ядерной мембраны на срезах обычно имели сложную конфигурацию.

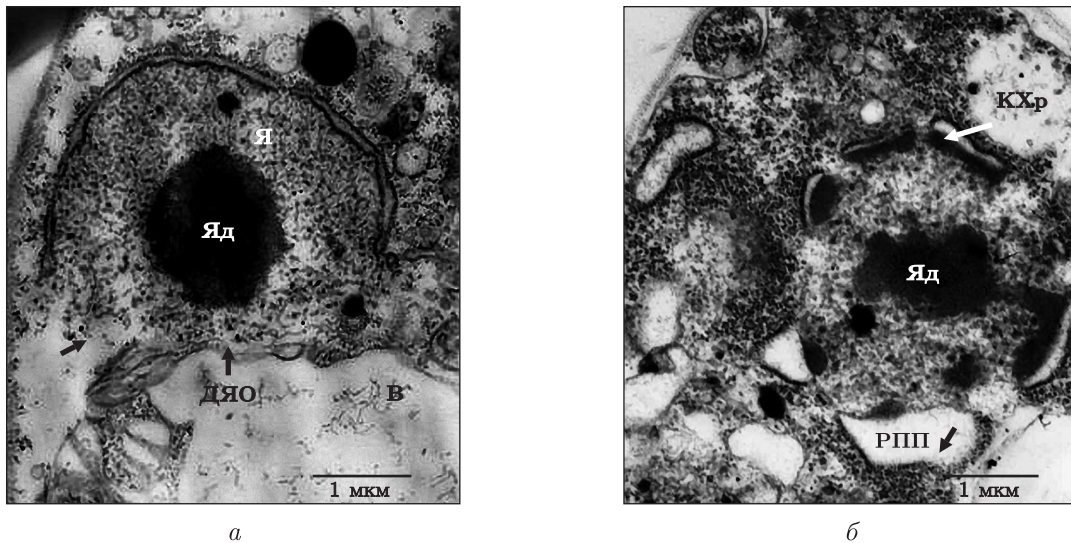


Рис. 4. Фрагменты клеток *Ch. reinhardtii* с ядрами при действии 10,0 мг/л оксиэтилового эфира полиэтиленгликоля, 5 сут (а, б). Условные обозначения: Я — ядро, Яд — ядрышко, РПП — расширение перинуклеарного пространства, ДЯО — дезинтеграция ядерной оболочки, В — вакуоль, КХр — конденсированный хроматин

Более высокая концентрация (5,0 мг/л) оксиэтилового эфира полиэтиленгликоля вызывала значительную вакуолизацию клеток, причем размер вакуолей часто достигал до 1/3 объема клеток. При увеличении длительности воздействия на культуру указанной концентрации до 3–5 сут структура ядер подвергалась существенным перестройкам — наблюдали дехроматизацию ядер, значительные расширения перинуклеарного пространства (см. рис. 3, б), а также дезинтеграцию ядерной оболочки на отдельных участках. Митохондрии, в отличие от контроля, часто формировали сложные комплексы неправильной формы размером до 1,5–2,0 мкм по их длинной оси с матриксом высокой электронной плотности и мелкими кристами (см. рис. 3, б).

Особенно значительные перестройки происходили в клетках *Ch. reinhardtii* под действием оксиэтилового эфира полиэтиленгликоля в концентрации 10,0 мг/л даже при кратковременной экспозиции. В хлоропластах клеток тилакоидная система была, как правило, неупорядоченной, причем наблюдались как значительные расширения интратилакоидного пространства, так и их слипание на определенных участках.

При увеличении длительности контакта культуры *Ch. reinhardtii* (до 5 сут) с неионогенным ПАВ в строме хлоропластов клеток значительно увеличивалось количество осмиофильных глобул (до 100–120 нм в диаметре). Структура ядер варьировала — часть ядер характеризовалась дехроматизацией, снижением электронной плотности кариоплазмы, дезинтеграцией ядерной оболочки или формированием различного размера расширений перинуклеарного пространства (рис. 4, а). В то же время часть ядер в клетках популяции имели повышенное количество гетерохроматина (см. рис. 4, б), локализованного не только вдоль ядерной оболочки, но и по всему объему ядер. При этом в таких ядрах также наблюдали значительные расширения перинуклеарного пространства (см. рис. 4, б).

Таким образом, полученные нами данные о широком спектре изменений клеточных компартментов клеток *Ch. reinhardtii* под действием оксиэтилового эфира полиэтиленгликоля, принадлежащего к классу неионогенных ПАВ, свидетельствуют о достаточно высокой сте-

пени его токсичности. Ранее было установлено также негативное влияние одного из неионогенных ПАВ — полиэтоксифирированного эфира сорбита [9].

Нами показано, что неионогенные ПАВ вызывают широкий спектр изменений клеточных компартментов, причем проявляются и специфические изменения ультраструктуры клеток водорослей в отличие от перестроек органелл под действием ПАВ других типов. Так, даже низкие концентрации неионогенных ПАВ приводят в первую очередь к структурным перестройкам ядер. Глубина и спектр ультраструктурных изменений в ядрах клеток расширяются при повышении концентрации (5,0–10,0 мг/л), причем часто возникшие перестройки несовместимы с нормальным функционированием ядер. В противоположность неионогенным ПАВ, анион- и катионактивные ПАВ существенно повышают прежде всего вакуолизацию клеток за счет структурных изменений цитоплазматической мембраны и мембран оболочек клеточных органелл [8], что усиливает их проницаемость для воды и повышает, таким образом, гидратацию клеточных компартментов, особенно хлоропластов. Ряд исследователей [3, 4, 6] показали, что фотосинтетическая система под действием анион- и катионактивных детергентов в первую очередь поддается значительным функциональным и структурным изменениям, что приводит к блокированию синтеза пигментов. Следует отметить, что различные химические загрязнители нередко вызывают обесцвечивание клеток водорослей [10].

Результаты исследований действия неионогенных ПАВ на ультраструктуру клеток *Ch. reinhardtii* подтверждают четкую зависимость степени ультраструктурных перестроек клеток от концентрации ПАВ и длительности их воздействия. Это открывает возможности использования цитологического метода для оценки влияния химических загрязнителей на состояние клеток планктонных водорослей, что, в конечном результате, дает возможность определить степень выживания организмов или их элиминацию. Данные о состоянии клеток планктонных водорослей под действием ПАВ важно учитывать при проведении контактного и дистанционного мониторинга для оценки качества поверхностных вод.

Автор выражает искреннюю благодарность д-ру хим. наук Т. В. Кармазинной, заведующей отделом адсорбции и адсорбционной очистки воды и промстоков Института коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины за предоставленные ПАВ.

Исследования финансировались согласно Распоряжению Президиума НАН Украины № 63 от 09.02.2009 г.

1. Кузьмина Н. С., Руднева И. И. Влияние сточных вод на морские водоросли // Альгология. – 2005. – **15**, № 1. – С. 128–136.
2. Ващенко М. А. Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия // Биол. моря. – 2000. – **26**, № 3. – С. 149–159.
3. Паршикова Т. С. Участие поверхностно-активных веществ в регуляции развития микроскопических водорослей // Гидробиол. журн. – 2003. – **39**, № 1. – С. 64–70.
4. Реунова Ю. А., Айздайчер Н. А. Влияние детергента на содержание хлорофилла α и динамику численности у микроводоросли *Chroomonas salina* (Wils.) Butch. (*Cryptophyta*) // Альгология. – 2004. – **14**, № 1. – С. 32–37.
5. Масюк Н. П., Посудин Ю. И., Лилицкая Г. Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*). – Киев, 2007. – 264 с.
6. Popova A. F., Parshikova T. V., Kemp R. Influence of catamine on structural-functional peculiarities of *Chlamydomonas reinhardtii* Dang cells // Int. J. Alga. – 2004. – **14**, No 3. – P. 229–239..
7. Мудрый И. В. Оценка комплексного и комбинированного воздействия сульфанола и синтамида-5 на организм в целях гигиенической регламентации применения СМС в быту: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Киев, 1985. – 21 с.
8. Popova A. F., Kemp R. Effects of surfactants on the ultrastructural organization of the phytoplankton, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anabaena cylindrica* // Arch. Hydrobiol. – 2007. – **169**, No 2. – P. 131–136.

9. Cantero M., Rubio S., Perez-Bellido D. Determination of non-ionic polyethoxylated surfactants in wastewater and river water by mixed hemimicelle extraction and lipid chromatograph ion trap mass spectrometry // J. Chromatogr. – 2005. – **1067**, No 1–2. – P. 161–170.
10. Кузьмина Н. С. Исследования токсического действия фунгицида купросата на *Platymonas viridis* Rouch. (*Chlorophyta*) // Альгология. – 2004. – **14**, No 2. – С. 127–134.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 17.12.2009

A. F. Popova, G. F. Ivanenko

Effects of various concentrations of nonionogenic surfactants on the ultrastructure of cells *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

The data on a wide spectrum of ultrastructural reorganizations of the compartments of Chlamydomonas reinhardtii cells under influence of different concentrations of nonionic surfactants, in particular of oxyethyl polyethylene glycol ether, are presented. It is shown that nonionic surfactants, first of all, cause the ultrastructural reconstructions of nuclei which are frequently incompatible with their normal functioning. The clear dependence of the degree of ultrastructural changes of the cell compartments on the surfactants concentration and the duration of their action on alga cells is established. The possibilities of the use of cytological analysis for the evaluation of the influence of chemical pollutants on a state of the cells of planktonic algae are discussed.