УДК 581.5+535.37:58.02

О. І. Даценко, М. А. Березовська, О. О. Григор'єва

РОСТОВІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРИ CHLAMYDOMONAS ACTINOCHLORIS ЗА НАЯВНОСТІ ПОВЕРХНЕВОЇ БЕНЗИНОВОЇ ПЛІВКИ

Вивчали вплив поверхневої бензинової плівки на чисельність і люмінесцентні властивості *Chlamydomonas actinochloris* в процесі розвитку культури. Встановлено, що кількість клітин зменшується лише в першу добу експерименту. Фотолюмінесцентні дослідження показали погіршення функціональних характеристик водоростей також лише на початку експерименту, надалі їхній стан відновлювався.

Ключові слова: *зелені водорості, бензин, фотолюмінесценція, кількість клітин.*

На сьогодні доволі часто спостерігається забруднення природних водойм нафтою та нафтопродуктами, тому актуальним питанням є дослідження реакції гідробіонтів на ці забруднювальні речовини. Відомо, що повільно окислювана фракція нафти може перебувати у воді надзвичайно довго і поповнюватися за рахунок поверхневого мікрошару та ґрунтів, зумовлюючи фонове забруднення [15]. При цьому вплив різних сортів нафти на організм залежить переважно від її концентрації, а не від особливостей хімічного складу [13].

Різні види водоростей неоднаково резистентні до дії нафти та бензину [1, 8, 9, 13]. З літератури відомі факти пригнічення приросту, порушення нормального поділу, втрати тургору клітин, зменшення вмісту хлорофілу *a* та каротиноїдів [1, 2, 11, 13, 16]. У той же час відмічена і певна адаптація до впливу нафтопродуктів і навіть стимуляція ними деяких життєвих функцій та показників, наприклад фотосинтезу. Стимулюючі дози були різними для різних видів [1, 9, 11, 14].

Ступінь впливу нафтопродуктів на одноклітинні водорості здебільшого визначається їх чисельністю. На нашу думку, корисним є поєднання цього методу з паралельною оцінкою функціонального стану клітин, що вижили [3—6]. Відомо, що дія зовнішніх чинників на рослини відбивається на їхніх люмінесцентних властивостях [17, 18]. Відомо також, що при нафтовому забрудненні води незворотні процеси у водоростях відбуваються порівняно швидко, проте загибель рослин вдається встановити лише через деякий час

© Даценко О. І., Березовська М. А., Григор'єва О. О., 2012

(10—15 діб) [2]. Люмінесцентний метод дослідження дозволяє визначити стан організму ще до того, як незворотні зміни під впливом чинника стануть видимими.

Метою роботи було дослідження впливу поверхневої бензинової плівки на розвиток культури зеленої водорості *Chlamydomonas actinochloris* Deason et Bold. Для цього впродовж усього експерименту реєстрували зміни чисельності клітин у культурі та її люмінесцентних параметрів.

Матеріал і методика досліджень. В експериментах використано культуру, що утримується в альгологічній колекції кафедри ботаніки біологічного факультету Київського національного університету (ACKU), штам ACKU 706-06. Проведено дві серії експериментів. У першій вихідна культура була розведена середовищем Болда і витримана дві доби, кількість клітин на початку досліджень становила близько $2 \cdot 10^5$ см$^{-3}$, у другій серії отримана культура була розведена середовищем Болда у співвідношенні 1 : 1 безпосередньо перед початком експерименту.

Дослідні та контрольні культури об'ємом по 400 мл утримували в однакових закритих циліндричних посудинах діаметром 8 см (площа поверхні близько 50 см^2). Культури утримувались у люміностаті з чергуванням темнової та світлової фаз 12 : 12, температурний режим в лабораторії відповідав природному (влітку). На поверхні дослідних культур знаходився бензин (А-92) об'ємом 0,5 см^3, відповідно товщина плівки становила близько 100 мкм. Оскільки водорозчинні фракції бензину розкладаються протягом кількох днів [15], щоденне перемішування суспензії здійснювали прокачуванням за допомогою шприца зі стаціонарно зафіксованою в посудині вертикальною голкою на трубці для уникнення руйнування плівки принаймні на початку експерименту. Аналогічна конструкція була передбачена і для взяття проб. Контрольні посудини були обладнані таким же устаткуванням. На певному етапі досліджень суспензія ставала занадто щільною, прокачування вже не забезпечувало ефективного перемішування, і воно здійснювалося простим збовтуванням.

Чисельність клітин у культурі підраховували в камері Горяєва за стандартною методикою [12] у восьми повторностях. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми «PAST_1_65». Контроль за функціональним станом клітин здійснювали шляхом вимірювання спектрів та інтенсивності фотолюмінесценції (ФЛ) водоростей, яка збуджувалась випромінюванням аргонового лазера з довжиною хвилі $\lambda = 488$ нм та потужністю близько 4 мВт. Під час вимірювання суспензію постійно перемішували за допомогою шприца для забезпечення рівномірного розподілу культури в об'ємі кювети та для зменшення впливу на результат явища деградації люмінесценції [19]. Вимірювання проводили за кімнатної температури. Спектри містили дві смуги з максимумами на довжинах хвиль $\lambda_{I} = 740$ нм та $\lambda_{II} = 683$ нм (рис. 1), джерелом яких вважають хлорофіл *a*, зв'язаний відповідно у фотосистемах I і II [7]. Інтегральну інтенсивність (відносна енергетична ефективність η) люмінесценції розраховували як площу під спектральною кривою в межах вимірювання. Люмінесцентні та кількісні па-

раметри культур контролювали щодня протягом 46 діб. Перші вимірювання було зроблено через 7 год після початку досліду.

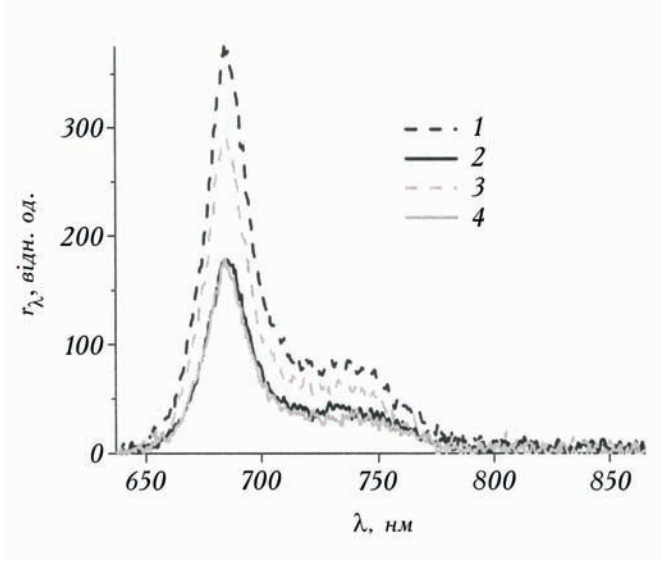
Результати досліджень та їх обговорення

За першу добу під впливом бензину кількість клітин (*C*) в одиниці об'єму суспензії помітно зменшилась (рис. 2). Надалі як у контрольних, так і у дослідних культур кількість клітин лише збільшувалась, хоча тривалий час останні дещо відставали у розвитку. Варто зазначити, що після 30-ї доби темп зростання суттєво збільшився. Очевидно, це було пов'язано зі зміною методики перемішування суспензії. Воно стало більш ефективним, і розмноження клітин відбувалося швидше.

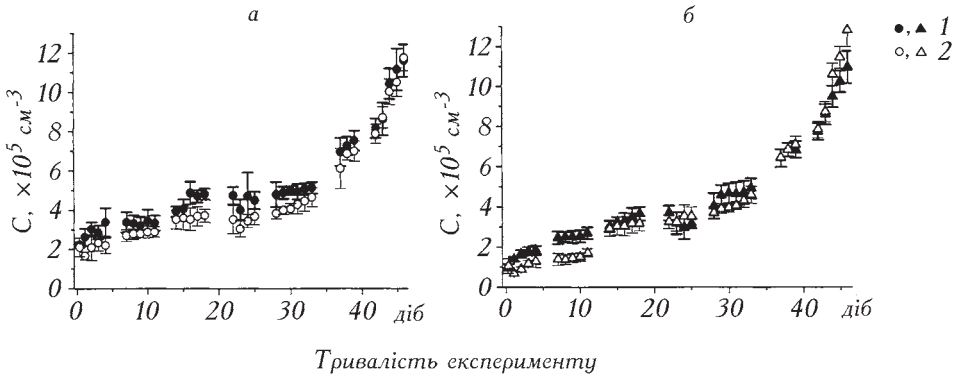
На рисунку 3 показано динаміку інтегральної інтенсивності ФЛ дослідних і контрольних культур. Одразу зазначимо, що ця величина досить сильно залежала від зовнішніх умов, у тому числі й погодних (наприклад, температури). Цим можна пояснити деяку немонотонність наведених на рисунку залежностей, особливо на кінцевому етапі.

Можна констатувати, що ефективність ФЛ дослідних культур була суттєво нижчою за ефективність контрольних уже на 7-му годину експерименту, потім відбувалось монотонне наростання значень залежності η та їх вихід на плато.

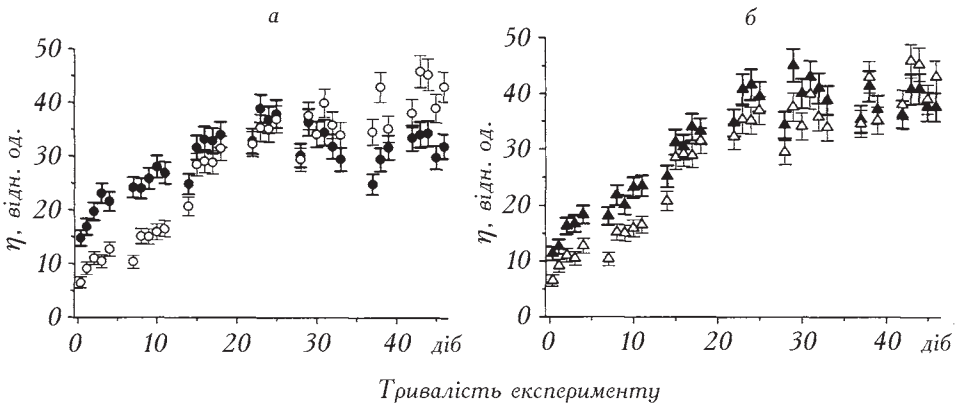
Слід відзначити, що представлені (див. рис. 3) значення інтенсивності характеризують суспензію в цілому. Більш інформативною є питома інтенсивність (питома відносна енергетична ефективність), що характеризує середню інтенсивність випромінювання однієї клітини. Ці дані наведено на рисунку 4. Як показали дослідження, у контрольній культурі нормальної концентрації вказана величина залишалась приблизно однаковою протягом майже всього періоду вимірювань, за винятком завершального етапу досліджень, коли кількість клітин помітно зростала (див. рис. 4). Це можна пояснити зменшенням прозорості суспензії,



1. Спектри ФЛ контрольної (*1*, *3*) та дослідної (*2*, *4*) культур *Ch. actinochloris* нормальної (*1*, *2*) та половинної (*3*, *4*) концентрації через 7 год після початку експерименту. По осі ординат наведено величину, пропорційну випроміненій енергії на одиницю спектрального інтервалу.



2. Динаміка чисельності клітин контрольних і дослідних культур нормальної (*а*) та половинної концентрації (*б*). Тут і на рис. 2 і 3: *1* — контроль; *2* — дослід.

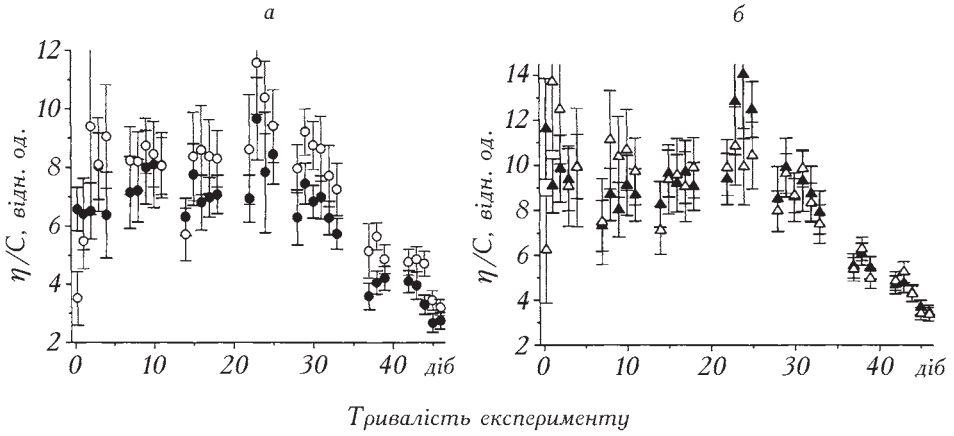


3. Динаміка інтегральної інтенсивності ФЛ культур нормальної (*а*) та половинної концентрації (*б*) в процесі експерименту.

внаслідок чого значній частині клітин бракувало світла.

Питома інтенсивність ФЛ експериментальної культури нормальної початкової концентрації (див. рис. 4, *а*) на 7-му годину експерименту була майже вдвічі нижчою, ніж у контролі, проте вже за 2 доби досягла стаціонарного рівня, який навіть дещо перевищував контрольні показники. Перевищення питомої інтенсивності дослідної культури над контролем спостерігалось і на завершальному етапі експерименту, коли ці значення в обох зразках почали знижуватись.

Питома інтенсивність контрольної культури половинної початкової концентрації (див. рис. 4, *б*) внаслідок розведення стрибкоподібно збільшилася, проте вже через добу повернулась до стаціонарного рівня, на якому залишалась протягом місяця — аж поки не почала спадати за зазначених вище причин. Під впливом бензину у культури цієї концентрації обидва ефекти на-

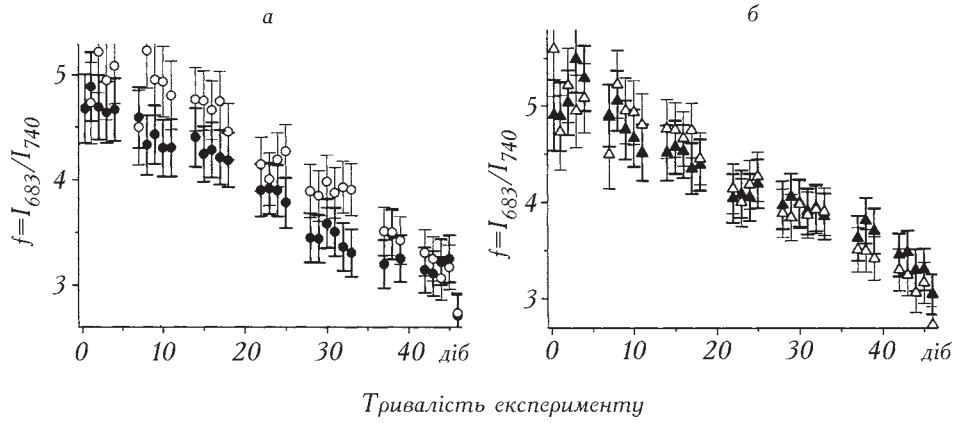


4. Динаміка питомої енергетичної ефективності люмінесценції культур нормальної (*а*) та половинної концентрації (*б*) в процесі експерименту.

кладаються: питома інтенсивність спочатку різко спадає, проте через добу відбувається такий же різкий підйом, після якого інтенсивність знижується до стаціонарного рівня.

Зменшення ефективності люмінесценції хлорофілу в рослині трактується здебільшого як погіршення її функціонального стану [18], хоча існує й протилежна думка [17]. У літературі зазначається переважно негативний вплив нафтопродуктів на живі організми [8—11, 13, 14, 16], тому в нашому випадку вважатимемо початкове зменшення ефективності ФЛ дослідного зразка порівняно з контролем ознакою погіршення функціонального стану, який надалі досить швидко покращився — очевидно, через природний розпад нафтопродукту. Відомо [15], що для напіврозпаду деяких водорозчинних (тобто найбільш токсично небезпечних) компонентів достатньо кількох годин, а тривалість повного розпаду здебільшого не перевищує кількох діб. Для дослідної культури з більшою концентрацією питома інтенсивність ФЛ вища, ніж для контрольної, на всьому графіку, за винятком початкової ділянки (див. рис. 4, *а*). Можна зробити припущення, що обробка бензином, попри негативний вплив на початку досліду, надалі стимулює розвиток дослідної культури, незважаючи на те, що в суспензії залишаються продукти розпаду бензину.

Механізм стимуляції розвитку культури негативним чинником може полягати в тому, що гинуть насамперед найслабші особини, а найбільш пристосовані виживають і потім швидко розмножуються, заповнюючи звільнений життєвий простір. Слід відмітити, що в роботі [5], де припущено такий механізм, гідробіонти зазнавали разової дії негативного чинника (мікрохвильового опромінення). В подальшому ті організми, що вижили після впливу радіації, досить швидко випереджали контрольну групу за чисельністю. У нашому ж випадку дія згубного фактора є більш тривалою, тому дослідні культури довгий час відстають від контрольних за кількістю клітин. Проте очевидно (див. рис. 2), що темп росту чисельності дослідних культур не нижчий,



5. Динаміка відносної інтенсивності спектральних смуг ФЛ культур нормальної (*а*) та половинної концентрації (*б*) в процесі експерименту.

ніж контрольних, тобто відставання зумовлене лише початковим зниженням їх кількості. Стимуляції розвитку може сприяти й використання водоростями продуктів розпаду бензину при фотоорганотрофному живленні [11].

Зазначимо також (див. рис. 4), що значення питомої інтенсивності ФЛ дослідної та контрольної культур половинної концентрації були фактично однаковими і вищими, ніж нерозведеної контрольної культури. Ймовірно, розведення культури саме по собі є достатнім стимулюючим фактором для її розвитку.

Слід згадати й інший показник функціонального стану рослини — відношення інтенсивностей смуг у спектрі $f = I(\lambda_{II}) / I(\lambda_{I})$. За літературними даними [18], його зменшення можна трактувати як погіршення функціонального стану. Зокрема, воно спостерігалось одночасно зі зменшенням кількості хлорофілу в рослині. Разом з тим, при негативних впливах на рослину параметр f в окремих випадках може й зростати.

Відповідні дані наведено на рисунку 5. Дія бензину на цей параметр не проявилась: протягом майже всього періоду досліджень значення f дослідної культури збігалося з контрольним у межах похибки вимірювання. Також для всіх зразків помітна тенденція до зменшення цього відношення з часом. Очевидно, це пов'язано зі старінням культур. Подібне явище вже спостерігалося нами у *Chlorella vulgaris* [3].

Висновки

Наявність бензинової плівки на поверхні суспензії тимчасово погіршує функціональний стан клітин *Chlamydomonas actinochloris*, що проявляється у зменшенні як концентрації, так і ефективності люмінесценції хлорофілу. Проте по мірі розпаду компонентів бензину культура швидко відновлюється, і надалі розмноження водоростей відбувається в такому ж темпі, як і в контролі. Більш того,

присутність бензину може стимулювати розвиток культури, оскільки в результаті його дії виживають особини, що характеризуються вищою життєздатністю.

**

Изучали влияние поверхностной бензиновой пленки на численность и люминесцентные свойства Chlamydomonas actinochloris в процессе развития культуры. Установлено, что количество клеток уменьшается лишь в первые сутки эксперимента, далее эта величина возрастает. В результате фотолюминесцентных исследований ухудшение функционального состояния клеток также обнаружено лишь в начале эксперимента, впоследствии восстанавливается.

**

Effect of the surface benzene film on the quantity and luminescent properties of Chlamydomonas actinochloris cells has been studied in course of the culture development. The cell number was found to decrease only on the 1st day of the experiment, later on this value increased. Photoluminescent analysis also indicated worsening of the cells functional state at the beginning of experiment, afterwards their state was restored and can even be better than of the control culture cells.

**

1. *Аксенова Е.И., Труфанова З.А.* О влиянии хлорофоса и нефтепродуктов на хлорококковые и синезелёные водоросли // Гидробиол. журн. — 1971. — Т. 7, № 6. — С. 86—90.
2. *Биологические* аспекты нефтяного загрязнения морской среды / Под общ. ред. О. Г. Миронова. — Киев: Наук. думка, 1988. — 248 с.
3. *Вакуленко О.В., Даценко А.И., Березовская, Григорьева О.О.* Фотолюминесцентная диагностика *Chlorella vulgaris* в процессе развития // Мониторинг окружающей среды: Сб. материалов междунар. науч.-практ. конф. — Брест: Брест. ун-т, 2010. — С. 148—151.
4. *Вакуленко О., Даценко О., Григор'єва О., Березовська М.* Реакція різновікових культур водорості *Chlorella vulgaris* Beijerinck на мікрохвильове опромінення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2011. — Вип. 55. — С. 20—26.
5. *Григорьева О.О., Березовская М.А., Даценко А.И.* Влияние микроволнового облучения на рост и эффективность фотолюминесценции зеленой водоросли *Chlamydomonas actinochloris* // Гидробиол. журн. — 2010. — Т. 46, № 2. — С. 108—114.
6. *Григор'єва О.О., Вакуленко О.В., Даценко О.І., Березовська М.А.* Люмінесцентний контроль впливу мікрохвильового випромінювання на зелені водорості // Там же. — 2011. — Т. 47, № 1. — С. 102—111.
7. *Гуляев Б.А., Тетенькин В.Л.* Критерий нативности пигмент-белковых комплексов и особенности их организации in vivo // Изв. АН СССР. Сер. биология. — 1983. — № 4. — С. 536—552.
8. *Исаева А.У., Саданов А.К., Оспанова Ж.Х.* Влияние нефти и нефтепродуктов на альгофлору и протозоофауну // Экология и безопасность в техносфере: Материалы Всерос. науч.-техн. интернет-конф. (дек.

2010 г.). — Орел: ФГОУ ВПО «Госуниверситет — УНПК», 2011. — С. 74—75.
9. *Кабиров Р.Р.* Влияние загрязнения почвы бензином на группировки водорослей // Почвоведение. — 1982. — № 10. — С. 111—112.
10. *Кабиров Р.Р., Сафиуллина Л.М.* Особенности экологии и распространения одноклеточной почвенной водоросли *Eustigmatos magnus* (J. B. Petersen) Hibberd (Eustigmatophyta) в Южном Урале (Россия) // Альгология. — 2008. — Т. 18, № 2. — С. 134—144.
11. *Курейшевич А.В., Гусейнова В.П.* Влияние нефтепродуктов на рост и содержание пигментов в культурах водорослей *Microcystis aeruginosa* и *Desmodesmus armatus* // Гидробиол. журн. — 2008. — Т. 44, № 2. — С. 75—87.
12. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник / Отв. ред. В. И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 552 с.
13. *Миронов О.Г.* Нефтяное загрязнение и жизнь моря. — Киев: Наук. думка, 1973. — 88 с.
14. *Миронов О.Г.* Взаимодействие морских организмов с нефтяными углеводородами. — Л.: Гидрометеоиздат, 1985. — 128 с.
15. *Михайлова Л.В.* Особенности поведения водорастворимой фракции нефти в модельных опытах // Вод. ресурсы. — 1986. — № 2. — С. 125—134.
16. *Мичурина Н.Ю.* Влияние нефти и пластовой воды на рост растений, концентрацию хлорофиллов и каротиноидов // Біорізноманіття. Екологія. Еволюція. Адаптація: Матеріали ювілей. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, присв. 180-річчю з дня народження Л.С. Ценковського (28 бер. — 1 квітня 2003 р.). — Одеса, 2003. — С. 100.
17. *Рубин А.Б.* Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образоват. журн. — 2000. — Т. 4, № 6. — С. 7—13.
18. *Фатеева Н.Л.* Дистанционная диагностика состояния растений на основе метода лазерно-индуцированной флуоресценции: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. — Новосибирск, 2007. — 19 с.
19. *Vakulenko O., Grygorieva O., Dacenko O.* Degradation of chlorophyll luminescence in plants // Ukr. J. Phys. — 2012. — Vol. 57, N 2. — P. 256—259.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшла 08.09.11