

УДК 576.311.342. + 581.1 + 582.561

**И.В. РЫЖИК**

Мурманский морской биологический ин-т КНЦ РАН,  
ул. Владимирская, 17, 183010 Мурманск, Россия  
alaria@yandex.ru

**ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК  
ФУКУСОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ТЕТРАЗОЛИЕВЫМ МЕТОДОМ**

---

Модифицирован тетразолиевый метод (МТТ-тест) оценки метаболической активности клеток фукусовых водорослей. Определены оптимальные условия подготовки проб и протекания реакции: концентрация МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид), температура, длительность взаимодействия с реагентом. Показана возможность использования МТТ-теста для оценки воздействия на водоросли факторов внешней среды, в т. ч. нефтяного загрязнения.

Ключевые слова: фукусовые водоросли, тетразолиевый метод, МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид), метаболическая активность клеток, соленость, нефтяное загрязнение.

**Введение**

Метаболическую активность клеток (МАК) можно оценивать по интенсивности отдельных физиологических процессов. Один из возможных способов определения МАК – оценка активности ферментов дегидрогеназ с помощью тетразолиевых красителей – солей МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) или ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолия хлорид). Низкий окислительно-восстановительный потенциал данных соединений обеспечивает перехват ими ионов  $H^+$ , переносимых НАД (никотинамидадениндинуклеотид) в процессе клеточного дыхания. При этом происходит восстановление тетразолиевых солей и их переход в водонерастворимую форму – формазан. Реакция идет в цитоплазме за счет деятельности цитоплазматических дегидрогеназ и в митохондриальной электронтранспортной цепи (Roche ..., 2004).

По интенсивности накопления формазана, который имеет фиолетовую окраску, оценивают метаболическую активность клеток. На этой основе был разработан метод оценки физиологического состояния клеток (МТТ-тест) животных, а также высших растений (Kalina, Palmer, 1968; Vistica et al., 1991; Huang et al., 2001; Schrader, Harries, 2006). Отдельные исследования были проведены на макроводорослях с тонкопластинчатым строением (Nam et al., 1998; Chang et al., 1999; Lu et al., 2006). На водорослях с более сложной организацией таллома метод не применяли.

Цель нашего исследования – модифицировать тетразолиевый метод для анализа метаболической активности клеток фукусовых водорослей, имеющих сложное псевдопаренхиматозное строение, а также оценить воз-

возможность использования данного метода для определения ответной реакции растительного организма на внешнее воздействие.

### Материалы и методы

Исследования проводили на сезонной биостанции ММБИ КНЦ РАН (пос. Дальние Зеленцы, восточное побережье Баренцева моря) в 2011 г.

Модификацию метода для фукусовых водорослей проводили на основе методов, разработанных для животных клеток (Vistica et al., 1991) и пластинчатых зеленых водорослей (Towill, Mazur, 1975; Chang et al., 1999).

Метаболическую активность клеток *Fucus vesiculosus* L. анализировали в апикальной (наиболее функционально активной) части талломов. На 1 пробу из верхушек свежесобранных растений пробковым сверлом ( $d = 5$  мм) брали по 1–2 высечки общей массой 15–20 мкг. Для оценки статистической достоверности получаемых результатов анализировали 15 проб.

Готовили исходный 5 %-ный раствор МТТ (Sigma) в 12 мМ трис-НСI-буфере (рН 7, 5), который для последующих опытов разбавляли до меньших концентраций фильтрованной морской водой. Каждую пробу помещали в 200 мкл раствора МТТ и инкубировали, периодически встряхивая. После инкубации пробу переносили в изопропанол ( $V = 1$  мл) на 2 ч для экстракции образовавшегося формазана. Экстракт центрифугировали в течение 5 мин при 3 тыс. об./мин и измеряли его оптическую плотность при длине волны 570 нм против изопропаноловой вытяжки проб, находившихся в морской воде без МТТ. Метаболическую активность клеток оценивали по оптической плотности растворов, расчет проводили на единицу массы высечек. Была проведена серия экспериментов с целью определения оптимальных условий (концентрация раствора МТТ, продолжительность инкубации, температура, условия освещения).

Возможность практического использования метода определяли в ходе эксперимента, в котором оценивали метаболическую активность клеток водорослей в условиях пониженной солености. Для этого свежесобранные талломы *F. vesiculosus* помещали на 1 ч в емкости с морской водой соленостью 33 (контроль), 25, 20, 15 и 10 ‰. Затем у растений определяли МАК и интенсивность видимого фотосинтеза по изменению содержания кислорода в воде, в которой находились водоросли, за определенный период, йодометрическим методом по Винклеру (Лурье, 1973). Интенсивность фотосинтеза рассчитывали в мкг  $O_2$  на 1 г сырой массы таллома в час.

Также проводили сравнение МАК водорослей, обитающих в различных по уровню загрязнения нефтепродуктами местах. Предварительно с помощью флюориметра "Флюорат 02–3М" (Люмэкс, Россия) оценивали уровень загрязнения нефтепродуктами в двух точках Кольского залива: морской порт (более чем в 10 раз превышены санитарно-гигиенические нормы ПДК) и губа Грязная (в пределах ПДК).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Excel. На рисунках показаны средние арифметические и доверительный интервал.

## Результаты

### Подбор оптимальных условий для МТТ-теста

#### 1. Концентрация МТТ

Для определения оптимальной концентрации были использованы растворы МТТ от 0,2 до 1,2 %. Исследования проводили при температуре 18 °С. Длительность нахождения проб в растворе МТТ составила 3 ч. Анализ полученных результатов показал, что оптимальной концентрацией является 0,8 %-ный раствор МТТ. Меньшего количества красителя недостаточно для взаимодействия со всем НАД клетки, при больших концентрациях наблюдается избыток реагента (рис. 1).

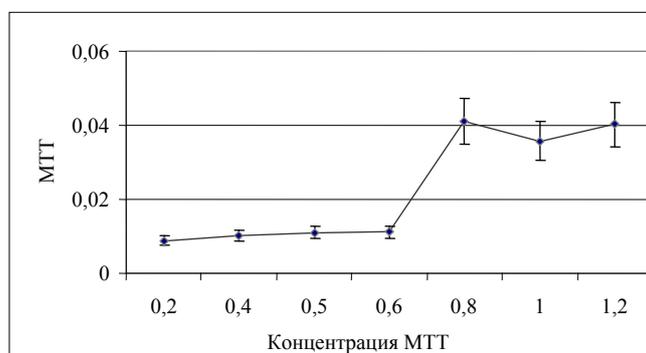


Рис. 1. Зависимость накопления формазана в клетках *Fucus vesiculosus* от концентрации МТТ. Здесь и на рис. 2, 3, 4, 6 ось ординат — оптическая плотность вытяжки при 570 нм, рассчитанная на 1 г сырой массы пробы

#### 2. Экспозиция

Для определения оптимального периода инкубации высечки помещали в раствор МТТ (0,8 %) на период от 1 до 24 ч при 18 °С и отсутствии освещения. Анализ полученных результатов показал, что оптимальный период нахождения высечек в растворе МТТ составляет 4 ч (рис. 2). В дальнейшем содержание формазана не увеличивается.

#### 3. Температура

Исследование влияния температуры на скорость протекания реакции проводили в диапазоне 5–25 °С. Содержание формазана увеличивалось при повышении температуры до 18 °С. При более высоких температурах количество формазана не изменялось.

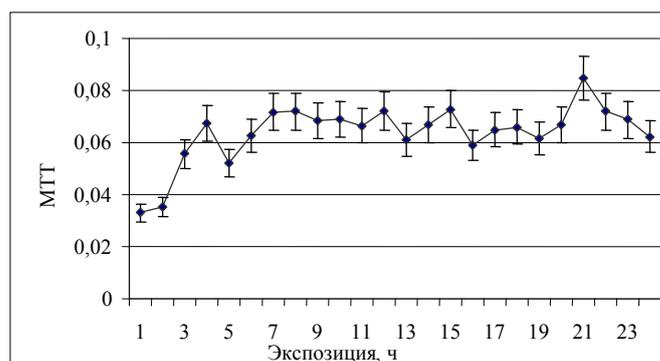


Рис. 2. Зависимость накопления формазана в клетках *Fucus vesiculosus* от времени инкубации

#### 4. Освещение

В темноте и на свету различной интенсивности (6 и 100 Вт/м<sup>2</sup>) накопление формазана было сходным, однако статистическая обработка результатов показала меньшее стандартное отклонение от средних значений у растений, содержащихся в темноте.

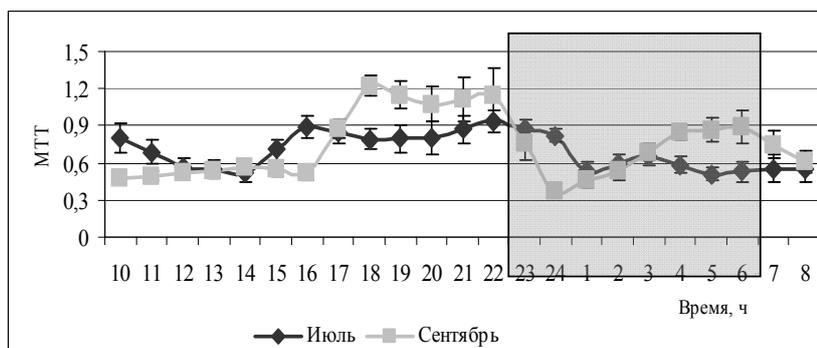


Рис. 3. Метаболическая активность клеток *Fucus vesiculosus* в течение суток. Штриховкой выделено темное время суток в сентябре

Результаты исследований свидетельствуют о том, что оптимальными условиями для проведения МТТ-теста являются: инкубация высечек при температуре 18 °С, темнота, время 4 ч, 0,8 %-ный раствор МТТ в морской воде.

#### Суточное изменение метаболической активности клеток

Наши исследования показали, что в течение суток метаболическая активность клеток фукусовых водорослей меняется. В летний период (июль) наблюдается повышение активности в вечернее время и снижение в начале ночи, четко выраженные пики отсутствуют. В осенний пе-

риод (сентябрь) выделяются 2 пика – во второй половине дня и в ночной период (рис. 3).

Подобное изменение МАК в течение суток, скорее всего, связано с процессами роста и деления клеток, поскольку сходная картина наблюдалась при исследовании циркадных ритмов ламинариевых водорослей: интенсивность деления клеток максимальна в середине ночного периода, а скорость роста таллома – в утренние часы (Lüning, 1994; Makarov et al., 1995).

#### Метаболическая активность клеток при различной солености

Соленость 25 ‰ не вызвала изменения МАК (все различия с контролем находятся в пределах ошибки). Дальнейшее понижение солености приводило к снижению МАК (рис. 4).

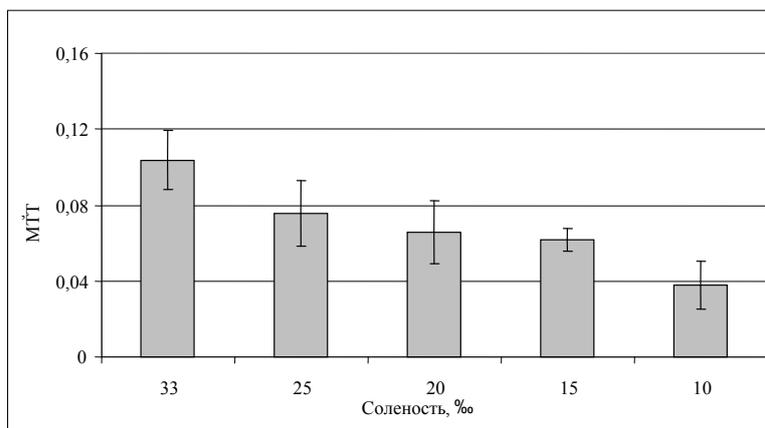


Рис. 4. Метаболическая активность клеток *Fucus vesiculosus* при различной солености

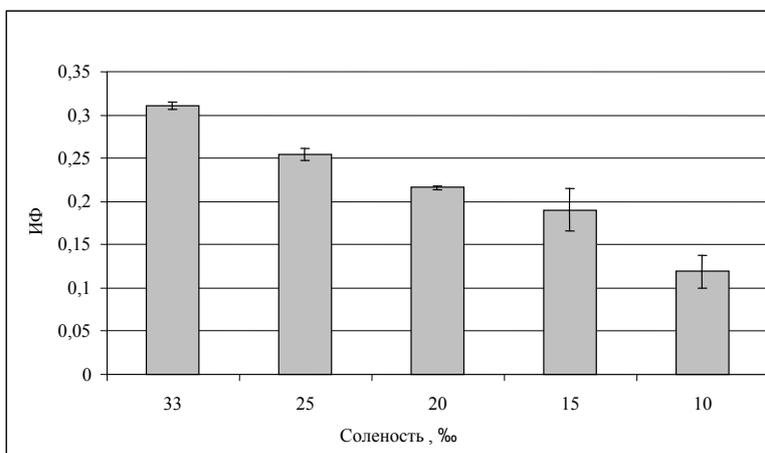


Рис. 5. Интенсивность видимого фотосинтеза *Fucus vesiculosus* при различной солености. Ось ординат – выделение кислорода, мкг  $O_2$  на 1 г сырой массы таллома в час

Воздействие солености ниже 15 ‰ на морские водоросли можно отнести к стрессовым. В этих условиях у организма отмечается снижение интенсивности ряда физиологических показателей: интенсивности фотосинтеза (ИФ) (рис. 5), скорости роста, содержания фотосинтетических пигментов (Дробышев, 1970, 1971; Малавенда, 2007).

Сравнение балтийских и атлантических популяций фукусовых показало, что у балтийских фукоидов при понижении солености увеличивается интенсивность роста, тогда как у атлантических отмечается гибель особей (Back et al., 1992; Serrao et al., 1996; Malm et al., 2001). На водорослях Шпицбергена было показано, что пониженная соленость вызывает уменьшение интенсивности фотосинтеза, снижение количества пигментов (Karsten et al., 1991; Karsten, 2007).

У водорослей в течение первых 5 ч нахождения при пониженной солености развивается состояние стресса, при котором значительно снижается дыхание поддержания. Затем начинаются процессы адаптации, в ходе которых дыхание увеличивается и на 5–10-е сутки достигает своего максимума, в дальнейшем сравниваясь с контролем (Тропин и др., 2003). Такой же период формирования адаптации показан и для *F. vesiculosus* (Малавенда, 2007).

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые также отмечали снижение МАК зеленой водоросли *Ulva fasciata* при понижении солености (Chang et al., 1999).

#### Метаболическая активность клеток при загрязнении нефтепродуктами

При обитании растений в условиях постоянного загрязнения нефтепродуктами МАК водорослей значительно выше, чем у растений из чистых районов (рис. 6).

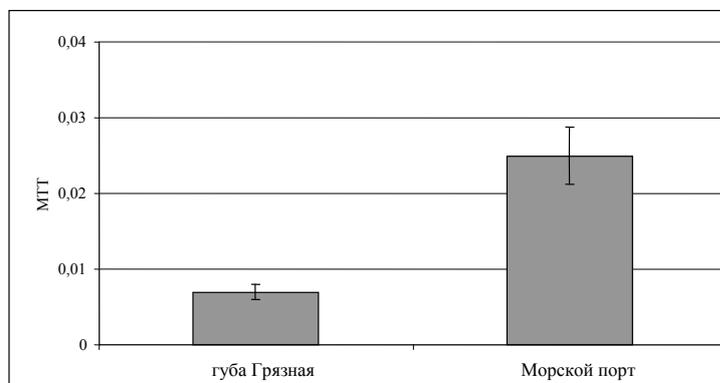


Рис. 6. Метаболическая активность клеток *Fucus vesiculosus* при различном уровне загрязнения нефтепродуктами

Нефтяное загрязнение является стрессовым фактором, однако при длительном воздействии некоторые макроводоросли, в частности

*F. vesiculosus*, приобретают устойчивость к нефтепродуктам (Coelho et al., 2000; Степаньян, Воскобойников, 2006). Выявленное в данном исследовании значительное увеличение МАК водорослей может свидетельствовать об активизации процессов, направленных на минимизацию негативного воздействия нефтепродуктов. Это могут быть как адаптивные, так и репарационные процессы, происходящие в клетках водорослей.

### Заключение

МТТ-тест можно использовать для оценки метаболической активности клеток водорослей со сложной организацией таллома, а также для оценки степени воздействия на растительный организм внешних факторов, в т.ч. антропогенного загрязнения.

Оптимальными условиями для проведения МТТ-теста являются: инкубация высечек при температуре 18 °С, темнота, время 4 ч, раствор МТТ в морской воде при концентрации 0,8 %. Экстракция формазана проводится в изопропанол в течение 2 ч. При необходимости элюат центрифугируют в течение 5 мин при 3 тыс. об./мин. Оптическую плотность растворов измеряют при длине волны 570 нм против изопропаноловой вытяжки проб, находившихся в морской воде без МТТ.

Данная методика была успешно опробована на родственных *Fucus vesiculosus* видах водорослей – *F. serratus* и *F. distichus*.

*Работа выполнена в рамках программы Kolarctic по проекту CETIA «Прибрежная среда, технологии и инновации в Арктике» (Coastal Environment, Technology and Innovation in the Arctic), направление 4 «Биологическая очистка с помощью водорослей».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дробышев В.П. Солеустойчивость некоторых видов бурых водорослей Белого моря // Цитология. – 1970. – 12, № 7. – С. 97–102.
- Дробышев В.П. Акклимация морских водорослей при содержании в средах различной солености // Экология. – 1971. – 1. – С. 96–98.
- Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. 2-е изд. – М.: Химия, 1973. – 376 с.
- Малавенда С.В. Влияние солености на фукусовые водоросли Баренцева моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Мурманск, 2007. – 24 с.
- Степаньян О.В., Воскобойников Г.М. Влияние нефти и нефтепродуктов на морфо-функциональные особенности морских макроводорослей // Биол. моря. – 2006. – 32, № 4. – С. 241–248.
- Тропин И.В., Радзинская Н.В., Воскобойников Г.М. Влияние изменения солености на темновое дыхание и структуру клеток талломов бурых водорослей литорали Баренцева моря // Изв. РАН. Сер. Биол. – 2003. – 1. – С. 48–56.
- Back S., C. Collins, G. Russell. Effects of Salinity on Growth of Baltic and Atlantic *Fucus vesiculosus* // Brit. Phycol. J. – 1992. – 27. – P. 39–47.

- Chang Wan-Chun, Ming-Hwa Chen, Tse-Min Lee. 2,3,5-Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress // Bot. Bull. Acad. Sin. – 1999. – **40**. – P. 207–212.
- Coelho S.M., Jan W., Rijstenbil, Murray T., Brown. Impacts of anthropogenic stresses on the early development stages of seaweeds // J. Aquat. Ecosyst. Stress Rec. – 2000. – **7**. – P. 317–333.
- Huang Y., Wang J., Li G., Zheng Z., Su W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2001. – **31**. – P. 163–167.
- Kalina M., Palmer J.M. The reduction of tetrazolium salts by plant mitochondria // Histochemie. – 1968. – **14**. – P. 366–374.
- Karsten U. Salinity tolerance of Arctic kelps from Spitsbergen // Phycol. Res. – 2007. – **55**. – P. 257–262.
- Karsten U., Wiencke C., Kirst G. The effect of salinity changes upon physiology of eulittoral green macroalgae from Antarctica and Southern Chile. I. Cell viability, growth, photosynthesis and dark respiration // J. Plant Physiol. – 1991. – **138**. – P. 667–73.
- Lu I-Fan, Ming-Shiuan Sung, Tse-Min Lee. Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata* // Mar. Biol. – 2006. – **150**, N 1. – P. 1–15.
- Lüning K. Circadian growth rhythm in juvenile sporophytes of *Laminariales* (Phaeophyta) // J. Phycol. – 1994. – **30**. – P. 193–199.
- Makarov V.N., Schoschina E.V., Lüning K. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine algae. I. Juvenile sporophytes of *Laminariales* (Phaeophyta) // Eur. J. Phycol. – 1995. – **30**. – P. 261–266.
- Malm T., Kautsky L., Enkvist R. Reproduction, recruitment and geographical distribution of *Fucus serratus* L. in the Baltic Sea // Bot. Mar. – 2001. – **44**. – P. 101–108.
- Nam Bo-Hye, Jin Hyung-Joo, Kim Se-Kwon, Hong Yong-Ki. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride // J. Appl. Phycol. – 1998. – **10**. – P. 31–36.
- Roche Applied Science. Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation: Manual. – Mannheim, 2004. – P. 1–7.
- Schrader K.K., Harries M.D. A rapid bioassay for bactericides against the catfish pathogens *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare* // Aquacult. Res. – 2006. – **37**. – P. 928–937.
- Serrao E.A., Kautsky L., Brawley S.H. Distributional success of the marine seaweed *Fucus vesiculosus* L. in the brackish Baltic Sea correlates with osmotic capabilities of Baltic gametes // Oecologia. – 1996. – **107**. – P. 1–12.
- Towill L.E., Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture // Can. J. Bot. – 1975. – **53**. – P. 1097–1102.
- Vistica D., Skehan Ph., Scudiero D., Monks A., Pittman A., Boyd M. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production // Canc. Res. – 1991. – **51**. – P. 2515–2520.

Поступила 5 марта 2012 г.

Подписала в печать А.В. Лищук-Курейшевич

*I.V. Ryzhik*

Murmansk Marine Biological Institute Kola Scientific Center RAS,  
17, Vladimirskaia St., 183010 Murmansk, Russia

ASSESSMENT OF METABOLIC ACTIVITY OF CELLS OF FUCOID ALGAE  
BY TETRASOL METHOD

The tetrasol method (MTT-test) for assessment of metabolic activity of cells of furoid algae was modified. Estimation of optimum conditions both sample preparation and reaction passing: concentration of MTT solution, temperature, time of interaction with reagent was carried out. A possibility of the MTT-test usage for an estimation of influence of environmental factors (including oil pollution) on a seaweeds is shown.

**Key words:** *Fucus vesiculosus*, MTT (3-[4,5-dimethyliazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), metabolic activity of cells (MAC), salinity, oil pollution.