

УДК 581.174: 574.632.017

А.Ф. ПОПОВА¹, Т.В. ПАРШИКОВА², Р. КЕМП³

¹ Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
Украина, 01001 Киев, ул. Терещенковская, 2

² Киевский национальный ун-т им. Тараса Шевченко,
Украина, 01017 Киев, ул. Владимирская, 64

³ Ин-т биологических исследований Уэльского ун-та,
Великобритания, Аберистунт

ВЛИЯНИЕ КАТАМИНА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

Исследовано влияние катионоактивного ПАВ – катамина (бензалкониум хлорид) на структурные изменения клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (*Chlorophyta*) и ее физиолого-биохимические показатели с использованием метода электронной микроскопии. Установлено, что в присутствии катамина при снижении численности клеток увеличивается их объем в результате нарушения состояния биомембран и усиления их проницаемости для воды. Одновременно регистрируются существенные деструктивные изменения в мембранах хлоропласта – слипание фотосинтетических мембран, увеличение интрамембранного пространства, а также разбухание пластиды, прогрессирующая вакуолизация и другие изменения клеточных органел, которые приводят к дегенерации клеток водоросли.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, катамин, ультраструктура, объем клеток, хлорофилл

Введение

Микроскопические водоросли играют важную роль в оценке качества поверхностных вод при проведении контактного и дистанционного мониторинга. Однако структурно-функциональные изменения, возникающие в их клетках и определяющие возможность выживания организмов или их элиминацию, исследованы недостаточно. Изучать это явление в природных условиях довольно сложно, поскольку развитие водорослей регулируется комплексом факторов. Одним из них являются поверхностно-активные вещества (ПАВ), загрязняющие природные воды. ПАВ широко используются в промышленности и сельском хозяйстве и, как результат, со сточными водами поступают в водоёмы. Понять причины, вызывающие структурно-функциональные изменения в сообществах и клетках водорослей можно лишь, проведя серию модельных экспериментов. Хотя результаты опытов в ряде случаев сложно экстраполировать на уровень природных сообществ, они широко применяются для выяснения влияния стрессовых факторов на тест-культуры водорослей.

Известно, что способность к проявлению поверхностной активности характерна для многих химических веществ природного (ППАВ) и синтетического происхождения (СПАВ). В настоящее время известно более 1000 СПАВ и их производных, которые входят в состав моющих и технических смесей, и используются как эмульгаторы, стабилизаторы, пенообразователи, а также при ликвидации разливов нефтепродуктов и др.

©А.Ф. Попова, Т.В. Паршикова, Р. Кемп, 2004

Проведенные ранее исследования (Брагинский и др., 1987; Nyberg, 1988; Паршикова и др., 1994; Parshikova, 1998) подтвердили значительное воздействие различных СПАВ на жизнедеятельность водорослей. Однако закономерности проявления этого влияния пока не выяснены.

Целью наших исследований было изучить последствия взаимодействия СПАВ с клетками тест-культуры *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (*Chlorophyta*) как на структурно-цитологическом, так и физиолого-биохимическом уровнях.

Материалы и методы

Из СПАВ в опытах было использовано катиоактивное ПАВ (КПАВ) катамин (бензалкониум хлорид) производства SIGMA (США), в больших объемах попадающее в природные воды (Таранова, 1987) и обнаруживаемое в водоемах в концентрациях 0,1-5 мг/л (Филенко, 1988).

Для электронной микроскопии клетки фиксировали 2,5 %-м раствором глоттарового альдегида на фосфатном буфере при pH 7,4 (в течение 2 ч при комнатной температуре), постфиксацию осуществляли 1 %-м OsO_4 в том же буфере (2 ч при 4°C). Фиксированные образцы обезжировали в серии спиртов с возрастающей концентрацией и заключали в Эпон-812. Ультратонкие срезы клеток получали на ультрамикротоме LKB-8800 (LKB, Швеция), контрастировали уранил-ацетатом и раствором цитрата свинца по Э. Рейнольдсу (Reinolds, 1976). Срезы образцов просматривали на электронном микроскопе 1200 EX (JEOL, Япония).

Для оценки особенностей роста тест-культуры использовали следующие показатели: численность клеток (счет в камере Горяева); величины площади поверхности (мкм^2) и объема (мкм^3) клеток, вычисленные по соответствующим формулам (Khutsen, Lien, 1981; Брянцева, 1999); оценку фотосинтетической активности и накопление хлорофилла *a*, измеренные флуорометрическим методом (на приборе Planctofluorometer FL 300 3M).

Для опытов использовали штамм водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* из коллекции Окриджской Национальной лаборатории (США). Контролем служила суспензия клеток этой водоросли с концентрацией 6,72 млн./мл, концентрацией хлорофилла *a* $189,5 \pm 7,5$ мкг/л и фотосинтетической активностью по показателю $\Delta F = 0,31 \pm 0,02$. Опыты проводили 3 сериями (повторность – 5-кратная), протяженность каждой серии – 7 дней.

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопический анализ структуры клеток после воздействия ПАВ показал значительную их изменчивость, причем степень ультраструктурных перестроек, зависела от концентрации исследуемого вещества.

Известно, что клетки *Chlamydomonas* в норме имеют удлинненно-овальную форму и массивный чашеобразный хлоропласт с 1-2 пиреноидами (рис. 1, а). У пучков тилакоидов обычно нет существенных изгибов; в строме хлоропласта наблюдаются отдельные фосфолипидные гранулы (3-10 на срезе пластиды), а также крахмальные зерна, локализованные как в строме между пучками тилакоидов, так и в составе амилогенной обкладки вокруг пиреноида. Последние

формируют коронкообразную структуру вокруг белковой части пиреноида. В амилогенной оболочке крахмальные зерна обычно имеют серповидную форму (Ладыгин и др., 2001)

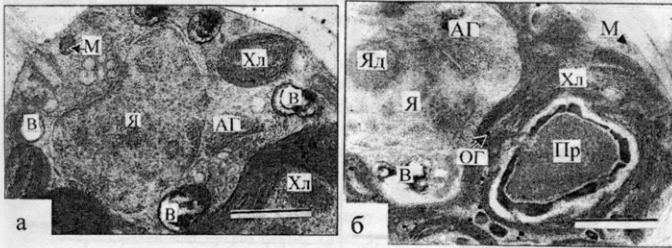


Рис. 1, а, б. Фрагменты клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.: контроль. Условные сокращения: Я – ядро, Яд – ядрышко, Хл – хлоропласт, М – митохондрия, АГ – аппарат Гольджи, В – вакуоль, Пр – пиреноид, ОГ – осмиофильная глобула.

В апикальной части хлоропласта, в непосредственной близости от двигательного аппарата клетки расположена стигма – органелла, способствующая светоориентации клеток. Основу ее составляют упорядоченно-локализованные осмиофильные глобулы, содержащие пигменты. В апикальной зоне цитоплазмы клеток находится ядро зухроматического типа, обычно содержащее одно ядрышко с преобладающим гранулярным компонентом (рис. 1, б). В зоне цитоплазмы вокруг ядра наблюдаются мелкие вакуоли, которые нередко содержат мелкие включения мизлинообразных структур, что, несомненно, является результатом автолитических процессов в вакуолярном аппарате клеток. Чашевидный хлоропласт содержит пиреноид (рис. 1, б). В периферическом слое цитоплазмы между цитоплазматической мембраной и хлоропластом находятся многочисленные митохондрии небольшого размера (см. рис. 1, а) до 0,8-1,0 мкм по длинной оси органелл. Крысты митохондрий невелики и расположены без строгой упорядоченности. Матрикс митохондрий, как правило, имеет среднюю электронную плотность.

Вакуоли клеток локализованы в апикальной части клетки, имеют диаметр до 0,3-0,6 мкм. Количество и размер их несколько увеличивается по мере старения клеток. Относительный объем вакуолей на клетку составляет 1,2 %.

При обработке клеток *Chlamydomonas* раствором катамина концентрацией 1 мг/л отмечается усиление вакуолизации клеток. При этом наблюдается существенный деплазмолиз клеток. В некоторых клетках вакуоли занимают до 20,0 % общего объема клетки (рис. 2, а), что нередко приводит к изменению формы клеток. Так, последние часто приобретают серповидную форму, очевидно, как результат асимметричного деплазмолиза клетки и объединения содержимого центральной вакуоли с периплазматическим пространством. Вакуоли клетки обычно локализуются в центральной зоне клетки, довольно часто вокруг ядра.

В процессе автолиза мелких вакуолей в них выявлялось мелкофибрилярное содержимое. Слияние нескольких вакуолей приводит к образованию крупной центральной вакуоли.

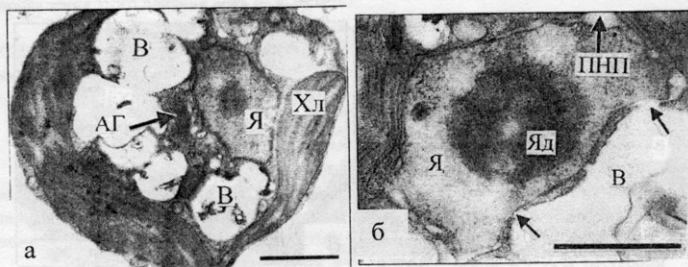


Рис. 2, а, б. Фрагменты клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (концентрация катанина 1 мг/л).
Условные сокращения (см. рис. 1): ПНП – перинуклеарное пространство.

Иногда вакуоли контактируют с ядром, в результате чего наблюдаются разные стадии его дегенерации. Это проявляется в существенной дехроматизации последнего, в результате чего кариоплазма приобретает очень низкую электронную плотность. В таких ядрах ядрышко становится бесструктурным и существенно уменьшается в размере (до 0,5 мкм в диаметре), в нем преобладает преимущественно гранулярный компонент. Нередко наблюдаются незначительного размера эвагинации наружной мембраны оболочки ядра, что приводит к расширению перинуклеарного пространства и нередко к дезинтеграции ядерной оболочки (рис. 2, б, указано стрелками). Существенных различий в структуре митохондрий в опыте и контроле не выявлено, хотя увеличивается частота встречаемости профилей митохондрий на срезе клетки. Из-за значительной вакуолизации клеток митохондрии часто располагаются в узких тяжах цитоплазмы между вакуолями, преимущественно в апикальной части клетки.

Следует отметить повышение активности аппарата Гольджи. Диктиосомы состоят обычно из 7-9 цистерн. На дистальных концах цистерны значительно расширены и продуцируют множественные мелкие везикулы. Последние часто локализованы группами, причем отдельные из них имеют электронно-плотное содержимое, тогда как другие полностью прозрачны.

Существенных изменений в структуре хлоропластов не наблюдается. Однако, отмечается уменьшение зерен крахмала, что подтверждается отсутствием типичной амилогенной обкладки вокруг пиреноида. Лишь изредка вокруг пиреноида наблюдаются тонкие крахмальные зерна. Пиреноид, как правило, имеет округлую форму. Строма пиреноида обычно сохраняет среднюю электронную плотность с четко заметными перфорациями тилакоидов.

Обработка клеток *Chlamydomonas* раствором катанина в концентрации 2 мг/л значительно усиливает вакуолизацию клеток, причем вакуоли занимают в клетке свыше 50 % ее объема.

В процессе автолиза мелких вакуолей в них выявлялось мелкофибрилярное содержимое. Слияние нескольких вакуолей приводит к образованию крупной центральной вакуоли.

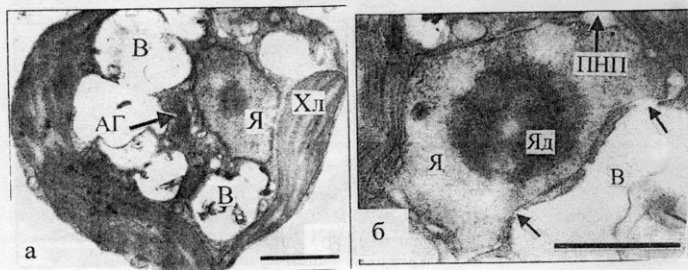


Рис. 2. а, б. Фрагменты клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (концентрация катамина 1 мг/л). Условные сокращения (см. рис. 1): ПНП – перинуклеарное пространство.

Иногда вакуоли контактируют с ядром, в результате чего наблюдаются разные стадии его дегенерации. Это проявляется в существенной дехроматизации последнего, в результате чего кариоплазма приобретает очень низкую электронную плотность. В таких ядрах ядрышко становится бесструктурным и существенно уменьшается в размере (до 0,5 мкм в диаметре), в нем преобладает преимущественно гранулярный компонент. Нередко наблюдаются незначительного размера эвагинации наружной мембраны оболочки ядра, что приводит к расширению перинуклеарного пространства и нередко к дезинтеграции ядерной оболочки (рис. 2, б, указано стрелками). Существенных различий в структуре митохондрий в опыте и контроле не выявлено, хотя увеличивается частота встречаемости профилей митохондрий на срезе клетки. Из-за значительной вакуолизации клеток митохондрии часто располагаются в узких тжах цитоплазмы между вакуолями, преимущественно в апикальной части клетки.

Следует отметить повышение активности аппарата Гольджи. Диктисомы состоят обычно из 7-9 цистерн. На дистальных концах цистерны значительно расширены и продуцируют множественные мелкие везикулы. Последние часто локализованы группами, причем отдельные из них имеют электронно-плотное содержимое, тогда как другие полностью прозрачны.

Существенных изменений в структуре хлоропластов не наблюдается. Однако, отмечается уменьшение зерен крахмала, что подтверждается отсутствием типичной амилогенной обкладки вокруг пиреноида. Лишь изредка вокруг пиреноида наблюдаются тонкие крахмальные зерна. Пиреноид, как правило, имеет округлую форму. Строма пиреноида обычно сохраняет среднюю электронную плотность с четко заметными перфорациями тилакоидов.

Обработка клеток *Chlamydomonas* раствором катамина в концентрации 2 мг/л значительно усиливает вакуолизацию клеток, причем вакуоли занимают в клетке свыше 50 % ее объема.

Нами отмечены частые случаи слипания тилакоидов, в результате таких перестроек формируются зоны с нарушенной структурой. Значительным изменениям подвергается и пиреноид, его электронная плотность существенно снижается, в ней наблюдаются только остатки белковой части пиреноида в виде гранулярных структур. Амилогенная обкладка предстает только тремя крахмальными зёрнами (рис. 3, б). Целостность оболочки хлоропласта на отдельных участках нарушается, что, очевидно, способствует разбуханию и увеличению его объема.

Таким образом, при воздействии на клетки *Chlamydomonas* раствора катанина в более высоких концентрациях (3,0-5,0 мг/л) основные изменения наблюдаются в ультраструктуре хлоропласта, которые затрагивают как сами фотосинтетические мембраны, так и всю пластиду в целом, что приводит к увеличению ее объема.

Проведенные модельные эксперименты с использованием различных концентраций КПАВ, которое в значительном количестве попадает в природные воды, показали, что это химическое соединение существенно влияет на структуру клеток как основу их функционирования. Это проявляется в изменении ультраструктуры ряда клеточных органелл, в первую очередь, субмикроскопической организации хлоропластов и митохондрий, а также прогрессирующей вакуолизации клеток. Отмеченные перестройки клеток под воздействием катанина приводят к существенным изменениям, часто не совместимых с жизнью клетки.

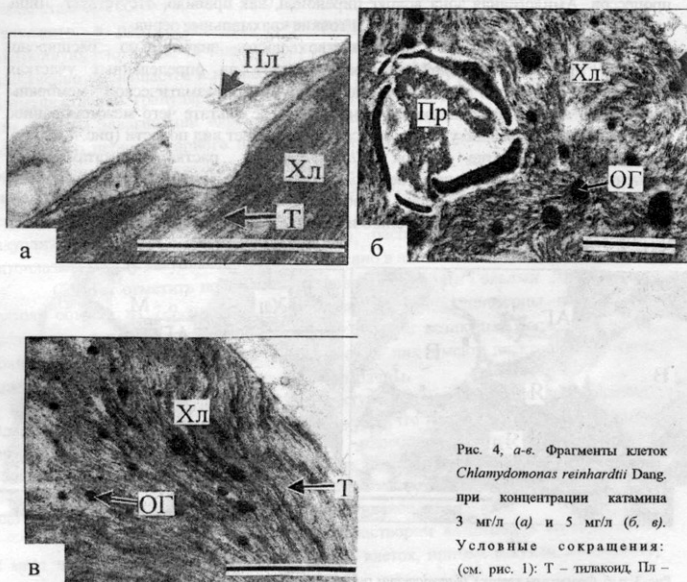


Рис. 4. а-в. Фрагменты клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. при концентрации катанина 3 мг/л (а) и 5 мг/л (б, в). Условные сокращения: (см. рис. 1): Т – тилакоид, Пл – плазмалемма.

Не менее существенно влияние ПАВ на функциональную активность клетки. Установлено, что КПАВ негативно влияет на все исследуемые функциональные показатели клетки, причем отмечается прямая коррелятивная взаимосвязь между степенью возникающих изменений с концентрацией ПАВ. Представляют интерес особенности реакции клеток водоросли на влияние КПАВ. При микроскопировании образцов мы обратили внимание на изменение численности и размерные характеристики клеток тест-культуры. Как видно, под влиянием КПАВ при снижении численности клеток (рис. 5) площадь их поверхности существенно изменяется (рис. 6). Это происходит вследствие разбухания клеток, которое тем значительнее, чем выше концентрация КПАВ и время контакта с клетками водоросли. Увеличение объема клетки зависит от концентрации катмина (например, при низких его концентрациях – в 2-3 раза, при 3 мг/л – в 3-20 раз, при 5 мг/л – в 17-30 раз). По-видимому, вследствие негативных структурных изменений оболочки изменялась и ее проницаемость для воды.

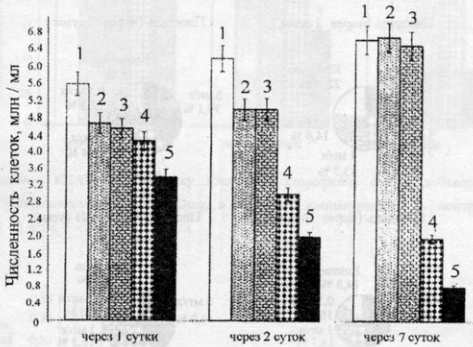


Рис. 5. Влияние различной концентрации катмина на изменение численности *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.: 1 – контроль; 2 – 0,1 мг/л; 3 – 1 мг/л; 4 – 3 мг/л; 5 – 5 мг/л.

Изменения морфометрических и физиологических показателей клеток микроводоросли под влиянием КПАВ свидетельствуют о существенном негативном влиянии катиоактивного детергента на мембраны фотосинтезирующих организмов, как первопроductентов органического вещества в водных экосистемах.

Изменение объемов клеток под влиянием КПАВ важно учитывать при биомониторинге с определением биомассы водорослей в водоемах, загрязненных КПАВ. В этом случае отклонение размерных характеристик клетки от типичных для нее параметров также может свидетельствовать о неблагоприятии в водной среде.

Как известно, хлорофилльный показатель широко используется в мониторинге водных объектов (Sirenko, Kureishevich, 1999). Поэтому, учитывая изменчивость численности и размерных характеристик клеток, мы уделили особое внимание анализу динамики концентрации хлорофилла в единице объема воды.

Полученные данные о динамике изменения хлорофилла *a* и фотосинтетической активности клеток под влиянием их контакта с КПАВ представлены на рис. 7, 8. Как видно из рис. 7, под влиянием катамина в концентрации 1-5 мг/л содержание хлорофилла закономерно снижалось тем существеннее, чем выше была действующая концентрация КПАВ и увеличивалась продолжительность контакта с ним водорослей.



Рис. 6. Влияние катамина на изменение площади поверхности клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

Под влиянием катамина изменялась и потенциальная фотосинтетическая активность клеток (рис. 8). Четкая концентрационная зависимость отмечена через 2 суток контакта. При дальнейшем увеличении его интервала концентрационная

зависимость нарушалась, особенно в интервале от 0,1 до 3 мг/л. Причины этого явления пока неясны. Не исключено, что они были связаны с динамикой изменения численности активно двигающихся клеток, увеличивающих скорость своего передвижения и попадающих в поле флуорометрического зондирования нативных суспензий водорослей в результате положительного фототаксиса.

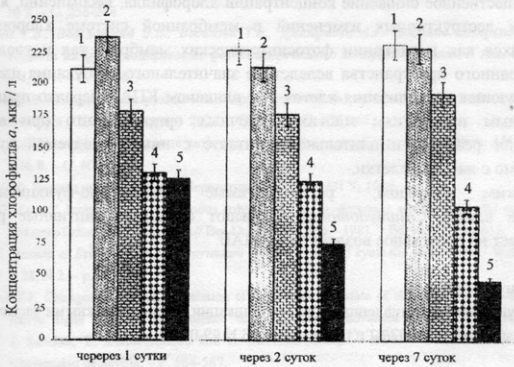


Рис. 7. Влияние КПАВ на динамику изменения хлорофилла *a* при добавлении в суспензию *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. в различной концентрации: 1 – контроль; 2 – 0,1 мг/л; 3 – 1 мг/л; 4 – 3 мг/л; 5 – 5 мг/л.

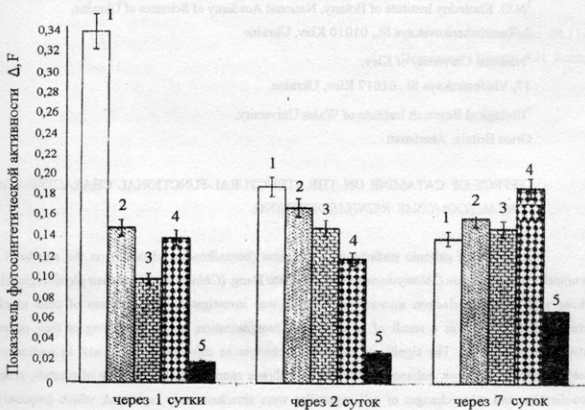


Рис. 8. Изменения потенциальной фотосинтетической активности (ΔF) под влиянием различной концентрации катамина: 1 – контроль; 2 – 0,1 мг/л; 3 – 1 мг/л; 4 – 3 мг/л; 5 – 5 мг/л.

Отмеченные структурные нарушения в клетках *Chlamydomonas* под влиянием КПАВ отражают наступившие в них функциональные изменения. Так, увеличение популяции митохондрий и их размера в опытных клетках, возможно, связано с повышением их энергетического потенциала (Паршикова, 2000), проявляющегося в возрастании скорости передвижения клеток.

Существенное снижение концентрации хлорофилла, несомненно, является результатом деструктивных изменений в мембранной системе хлоропластов, отражающихся как в слипании фотосинтетических мембран, так и увеличении интрамембранного пространства вследствие значительного разбухания пластиды. Прогрессирующая вакуолизация клеток под влиянием КПАВ нередко приводит к деструктивным изменениям многих клеточных органелл, что при высокой концентрации реагента и длительном контакте с ним исследуемой культуры несовместимо с жизнью клетки.

Таким образом, регистрируемые структурно-функциональные перестройки клеток *Chlamydomonas* отражают сложные адаптивные реакции клеток в ответ на негативное воздействие КПАВ.

Благодарности

Результаты, представленные в этой публикации, стали возможными частично благодаря гранту ГКНТ 06.07/82 и проекту INTAS N 99-0130.

A.F. Popova¹, T.V. Parshikova², R. Kemp³

¹N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkivskaya St., 01010 Kiev, Ukraine

²National University of Kiev,
17, Vladimirska St., 01017 Kiev, Ukraine

³Biological Research Institute of Wales University,
Great Britain, Aberistwit

EFFECT OF CATAMINE ON THE STRUCTURAL-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF *CHLAMYDOMONAS REINCHARDTII* DANG.

Influence of cationic surfactants – catamine (benzalkonium chloride) on the structural changes of the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (*Chlorophyta*) and their physiological-biochemical indices with using of electron microscopic method was investigated. The decrease of cells number and an increase of its volume as a result of biomembrane reorganization and strengthening of their penetrability for water were established. The significant destructive changes in chloroplast membrane, in particular, gluing of photosynthetic membranes, enhancement of intramembrane space, and also swelling of plastids, progressive cell vacuolization and other changes of cell organelles were simultaneously registered, which frequently cause the degeneration of algae cells.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, catamine, ultrastructure, cell volume, chlorophyll.

- Брагинский Л.П., Величко И.М., Щербань Э.П. Пресноводный планктон в токсической среде. – Киев: Наук. думка, 1987. – 179 с.
- Брянцева Ю.В. Изменчивость структурных характеристик фитопланктона в Черном море: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 1999. – 21 с.
- Ладыгин В.Г., Ширишкова Г.Н., Семенова Г.А., Креславский В.Д. Ультраструктура хлоропластов и рост клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при действии холинхлорида // Биофизика. – 2001. – 46, № 2. – С. 256-264.
- Паршикова Т.В., Веселовский В.В., Веселова Т.В., Дмитриева А.Г. Влияние поверхностно-активных веществ на функционирование фотосинтетического аппарата хлореллы // Альгология. – 1994. – 4, № 1. – С. 38-46.
- Паршикова Т.В. Взаємозв'язок рухливості мікродоростей та резистентності їх клітин до дії хімічних факторів // Укр. бот. журн. – 2000. – 57, № 6. – С. 658-663.
- Таранова Л.А. Біологічне руйнування катіонних поверхнево-активних речовин // Вісн. АН УРСР. – 1987. – № 8. – С. 40-50.
- Филенко О.Ф. Водная токсикология. – Черноголовка: Изд-во МГУ, 1988. – 156 с.
- Knutsen G., Lien T. Properties of synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* under optimal conditions and some factors influencing them // Ber. Deutsch. Bot. Ges. – 1981. – Bd. 94. – P. 599-611.
- Nyberg H. Growth of *Selenastrum capricornutum* in the presence of synthetic surfactants // Water Res. – 1988. – 22, N 2. – p. 217-223.
- Parshikova T.V. Changes in content, correlation of fatty acids and state of chlorophyll-protein-lipid complex of native algae cells in the presence of surfactants // advances in plant lipid research (Ed. by J. Sanchez, E. Cerda-Olmedo and E. Martinez-Force). – 1998. – Secretariado de Publicaciones, Universidad de Sevilla. – P. 564-567.
- Reinolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biology. – 1976. – 17. – P. 208-212.
- Sirenko L.A., Kureishovich A.V. Peculiarities of water bloom formation caused by Cyanobacteria (*Cyanophyta*) in the regulated Dnieper river (on the example of its reservoirs) // Acta Agronom. Ovarien. – 1999. – 41, N 2. – . 229-241.

Получена 08.11.02

Підписав в печать А.И. Божков