

Н. М. Мухамеджанов, В. А. Агеевец, К. В. Квитко

СРАВНЕНИЕ ДИНАМИКИ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* И ЗООХЛОРЕЛЛЫ *CHLORELLA VARIABILIS* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТА АЦИКЛОВИР

Введение

Водоросли рода *Chlorella* представляют интерес в самых разнообразных областях науки. Свободноживущие хлореллы изучаются как потенциальный источник биотоплива [1], как организмы, участвующие в формировании микробного сообщества, обладающего выгодными биоремедиационными свойствами [2]. Они также используются в качестве объекта для оценки уровня загрязнения окружающей среды по уровню сохранения оптической плотности в растворе (острый тест) [3] или по уровню флуоресценции фотосинтетического аппарата [4]. Основными критериями биотестирования являются обычно выживаемость и способность к размножению [5]. Современный подход основан на использовании организмов в качестве универсальной индикаторной системы [6]. Объект для биотестирования должен быть чувствителен к токсичным примесям различной природы и обладать признаком, который позволит регистрировать угнетение организма или клетки. Этим критериям отвечают различные микроводоросли, особенно широко применяются штаммы *Chlorella vulgaris*. Несмотря на успешное применение свободноживущих хлорелл в качестве объекта биотестирования, поиск более чувствительных штаммов или способов повышения чувствительности клеток продолжается. В настоящее время исследовательские работы по свободноживущим хлореллам носят преимущественно прикладной характер в отличие от работ по эндосимбиотическим зоохлореллам, которые являются классической моделью для изучения симбиотических систем [7–9]. В данной работе мы предлагаем в качестве тест-объекта *Chlorella variabilis* (т.е. эндосимбиотические хлореллы), как более чувствительную к внешним воздействиям систему по сравнению с *Chlorella vulgaris*, типичными обитателями почв и вод [10].

Процесс адаптации клеток к условиям проведения теста остается важным фактором, определяющим конечную чувствительность биотеста. В качестве метода оценки токсичного действия выбранного нами препарата Ацикловир был использован параметр изменения интенсивности замедленной флуоресценции (ЗФ) [4, 11–13]. В основе этого метода лежит измерение флуоресценции хлорофилла, который является «природным датчиком состояния клеток водорослей» ([13], с. 8). При изменении состояния мембран фотосинтетического аппарата под действием внешнего фактора происходят функциональные изменения процесса фотосинтеза, которые регистрируются методами измерения флуоресценции [13]. Замедленная флуоресценция — интегральный показатель метаболического состояния фотосинтезирующих клеток, что было показано в работе авторов [4] используемого нами для измерения ЗФ прибора «Фотон-9», разработанного специалистами Красноярского государственного университета. Природа

этого свечения состоит в том, что хлорофилл после светового возбуждения испускает слабое длительно затухающее свечение, которое происходит за счет энергии, выделяемой в ходе темновых реакций фотосинтеза, отсюда и название — «замедленная флуоресценция». Интенсивность ЗФ увеличивается при блокировании транспорта электронов [13]. При воздействии повреждающих факторов на клетку интенсивность ЗФ меняется. Медленные изменения интенсивности ЗФ как в положительную, так и в отрицательную стороны связаны с адаптацией клеток в ходе измерения этого признака. Таким образом, мы получаем сигнал о воздействиях на транспорт электронов при увеличении ЗФ и деструкции систем клетки при резком падении. Одной из методических задач при выполнении данной работы был поиск способа количественной оценки эффектов регистрируемых по динамике ЗФ.

Материалы и методы исследования

В работе использовались два штамма: CALU 157 — штамм свободноживущей хлореллы, *Chlorella vulgaris*, выделенный Б. В. Громовым [14], и штамм NC64A — зоохлореллы *Chlorella variabilis* [15], являющийся типовым штаммом южного экотипа — симбионтом инфузории *Paramecium bursaria* [7, 8]. Первый штамм хорошо растет на свету в минеральных средах, способен расти на среде с добавкой органических веществ как на свету, так и в темноте, а зоохлорелла для своего размножения требует добавки аминокислоты, который используется в микробиологической практике для приготовления обогащенных органическими веществами питательных сред и является источником азота. Для выравнивания условий оба штамма культивировались в среде ВВМ [7] с добавлением аминокислоты (ВВМ + АК) до 10% по объему при комнатной температуре в условиях круглосуточной освещенности 2000 лк. Водоросли выращивались в колбах объемом 250 мл, содержащих 150 мл среды. Время культивирования клеток не превышало семи суток, что обеспечивало использование в экспериментах суспензии клеток, находящейся в активном состоянии. В качестве токсичного агента использовался препарат Ацикловир в виде раствора для инфузий (в конечной концентрации 1,25 мг/мл), который разводили стерильным физраствором согласно инструкции по применению и добавляли к суспензиям клеток через 30–60 мин после начала эксперимента. Это позволило оценить метаболическое состояние клеток в условиях эксперимента до внесения Ацикловира. Предварительно был поставлен контроль, где к клеткам вносился физраствор с добавлением щелочи (NaOH), являющейся вспомогательным веществом препарата Ацикловир. Его влияния на динамику ЗФ обнаружено не было.

В каждом эксперименте использовались культуры одного возраста. Динамика метаболического состояния клеток оценивалась по уровню замедленной флуоресценции фотосинтетического аппарата клеток водорослей при высокой интенсивности возбуждающего света 640 нм с помощью флуориметра «Фотон-9». Другой показатель, также зарегистрированный во всех экспериментах, — замедленная флуоресценция при низкой интенсивности возбуждающего света, оказался менее информативным при воздействии Ацикловира, и дальнейший анализ проводился на основе замедленной флуоресценции при высокой интенсивности возбуждающего света. Перед экспериментом клетки отмывались от аминокислоты в минеральной среде ВВМ для устранения окраски среды как фактора поглощения свечения. Для клеток, перенесенных из освещаемого пространства в камеру прибора, где единственным источником света являются

кратковременные лазерные импульсы высокой и низкой интенсивности, смена освещения является шоквым вариантом условий, адаптация к которым культуры миксотрофа (NC64A) и автотрофа (CALU 157) была различной в ходе измерения ЗФ (см. рис. 1). Поэтому момент воздействия токсичного препарата отдался на 30–60 мин от момента начала регистрации ЗФ.

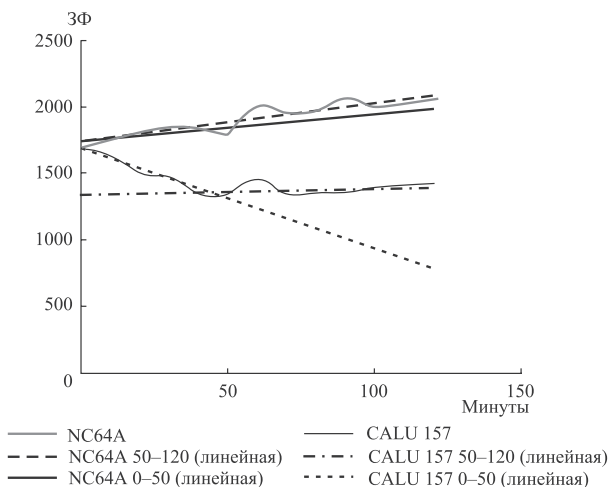


Рис. 1. Линейная аппроксимация динамики ЗФ в интервале 0–50 и 50–120 мин

Схема эксперимента: использовалось 8 кювет с суспензией клеток (в одной кювете по 2 мл), для каждого штамма использовались 2 кюветы без добавления препарата и 2 кюветы с добавлением через 30–60 мин по 100 мкл раствора Ацикловира, что составляло 1/20 объема суспензии и фактически не снижало оптическую плотность. Опыты проходили при комнатной температуре.

Статистическая обработка. Для каждого повтора опыта строили график зависимости уровня ЗФ от времени и, разбивая его на отрезки, линейные аппроксимирующие тренды. Использовали уравнение линейной регрессии зависимости интенсивности ЗФ от времени воздействия стрессорирующего фактора. Надежность оценки определяли величиной коэффициента детерминации — R^2 , или соотношением коэффициента корреляции и дисперсии. Для минимизации случайных флуктуаций при анализе динамики ЗФ использовались коэффициенты из уравнения линейной аппроксимации для средней величины динамики ЗФ двух одновременных повторов [16].

Результаты исследования

Адаптация к условиям измерения ЗФ. Условия в приборе «Фотон-9» (темнота и вспышки лазера) являются специфическими воздействиями, которые необходимо учитывать при анализе параметров замедленной флуоресценции. Динамика интенсивности замедленной флуоресценции для клеток, к которым не добавлялся токсический агент, т.е. характеристика прохождения адаптации к условиям измерения ЗФ клеток двух штаммов принципиально отличается (см. рис. 1). Для количественного выраже-

ния степени воздействия условий эксперимента на клетки водорослей динамика ЗФ разбивается на линейные отрезки. В данном случае выбран интервал 0–50 мин и 50–120 мин, которые линейно аппроксимированы. Для штамма CALU 157 показатель за первые 50 мин снижается, а для штамма NC64A в тот же период растет (см. рис. 1; табл. 1).

Два одновременных повтора в эксперименте без добавки Ацикловира (NC64A и CALU 157 — средние значения динамики ЗФ двух повторов для каждого штамма).

Таблица 1. Уравнения линейной аппроксимации динамики ЗФ для штаммов CALU 157 и NC64A (приведены уравнения из опыта № 1)

Интервал, минута	NC64A	CALU 157
0–50	$Y = 2,1743x + 1731,6$ $RI = 0,5384$	$Y = -7,5014x + 1686,5$ $RI = 0,9537$
50–120	$Y = 2,8031x + 1746,7$ $RI = 0,5465$	$Y = 2,1743x + 1731,6$ $RI = 0,5384$

Примечание. Значения, выделенные жирным шрифтом — это коэффициент перед «x» в уравнении линейной аппроксимации (значения линейной аппроксимации для опытов № 1–4 даны в табл. 2).

Для описания динамики ЗФ используется скорость увеличения (если значения положительные) или падения (если значения отрицательные) величины ЗФ (за одну минуту) в изучаемом интервале времени.

Таблица 2. Скорость изменения ЗФ в интервале адаптации

Признаки, характеризующие адаптацию к условиям изменения ЗФ	Опыт №1	Опыт №2	Опыт №3	Опыт № 4
Интервал адаптации (минуты)	0–50	0–50	0–30	0–40
ЗФ NC64A в нулевой точке	1696	2332	1416	1488
ЗФ CALU 157 в нулевой точке	1693	1921	2204	1907
Скорость изменения ЗФ клеток NC64A	2,1743	1,8086	13,995	18,935
То же для CALU 157	-7,5014	-7,2057	-15,41	-5,21

Все коэффициенты скорости для штамма зоохлореллы NC64A имеют положительное значение в отличие от штамма свободноживущей хлореллы CALU 157, где значения отрицательные, что свидетельствует о динамике уменьшения интенсивности ЗФ у штамма CALU 157 и роста у штамма NC64A.

Влияние ингибитора на динамику ЗФ. Добавление Ацикловира к суспензиям клеток вызывает быстрое изменение уровня ЗФ (рис. 2), что свидетельствует об ингибировании фотосинтетической функции в очень короткий период (5–10 мин). Затем следует повышение уровня ЗФ.

В серии экспериментов было показано, что Ацикловир вызывает у клеток штамма NC64A резкое падение показателя ЗФ, после чего наблюдается быстрое частичное восстановление и адаптация, при этом реакция клеток штамма CALU 157 менее выражена. Количественно степень ингибирования можно обозначить процентным

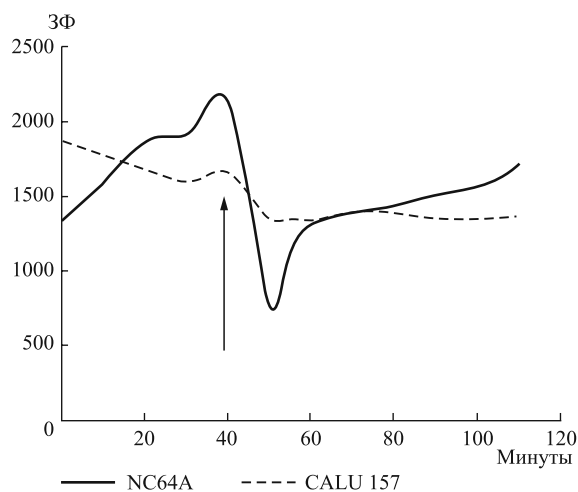


Рис. 2 Динамика 3Ф клеток штаммов NC64A и CALU 157 в 4-м опыте с внесением на 40-й минуте препарата Ацикловир (динамика 3Ф клеток без внесения Ацикловира представлена на рис. 1)

Стрелкой указан момент внесения Ацикловира.

отношением. Данные для серии экспериментов приведены в табл. 3. Эти значения выражают падение 3Ф через 10 мин после добавления Ацикловира.

Таблица 3. Снижение 3Ф после внесения Ацикловира (в % к исходному уровню)

Реакция клеток двух штаммов на внесение Ацикловира (в % к контролю)								
Номер опыта	Опыт №1		Опыт №2		Опыт №3		Опыт №4	
Снижение 3Ф после АЦ NC64A	42,2	29,3	50,7	50,8	68	66,7	65,2	61,6
То же для CALU 157	22,4	18,6	19,3	15,2	21,3	24,3	17,1	20,2

Примечание. АЦ — Ацикловир.

Различия в повторах выявлены в первом опыте, в остальных трех опытах данные для парных кювет отличаются незначительно.

Как следует из данных табл. 2, для симбиотического штамма NC64A характерно большее падение 3Ф, что, возможно, связано с большей чувствительностью клеток к воздействию Ацикловира. Штаммы достоверно отличаются по данному признаку (использовался тест Манни—Уитни).

Характерной особенностью реакции клеток зоохлорелл на внесение Ацикловира является восстановление уровня 3Ф (см. рис. 2), которое можно разбить на два этапа. Первый этап начинается через 10 мин после внесения Ацикловира и представляет собой быстрый подъем показателя 3Ф в следующие 10 мин, после чего скорость роста показателя 3Ф снижается (второй этап). Уровень восстановления в первый («быстрый») этап выражен как процентное соотношение к уровню 3Ф в момент первого измерения после внесения Ацикловира (через 10 мин). Второй этап восстановления («медлен-

ный») можно выразить с помощью коэффициента при « x » в уравнении линейной аппроксимации (см. табл. 3). Для свободноживущего штамма динамику ЗФ после первой реакции клеток на внесение препарата также можно выразить коэффициентом при « x », не разбивая на отрезки, так как «быстрая» адаптация отсутствует.

Восстановление ЗФ после внесения препарата в суспензию клеток штамма CALU 157 менее выражено и, скорее, соответствует сохранению уровня ЗФ, который был достигнут в момент первого измерения с добавлением Ацикловира. Коэффициенты скорости изменения ЗФ приведены в табл. 4.

Таблица 4. Показатели восстановления уровня ЗФ клеток штамма NC64A после 10 мин с момента внесения в суспензию клеток Ацикловира

Значения величин ЗФ штамма NC64A в опытах	Опыт №1		Опыт №2		Опыт №3		Опыт №4	
	A*	1060	1391	1104	1147	626	578	656
B**	1288	1451	1194	1233	1274	1321	1199	1414
B — соотношение A/B	17,8	4,2	7,6	7	50,9	52,5	54,7	64,4
Г — прирост ЗФ за 1 мин	4,35	3,28	6,46	7,24	4,35	2,49	5,46	9,58

П р и м е ч а н и е. A* — уровень ЗФ через 10 мин после внесения препарата; B** — уровень ЗФ через 20 мин после внесения препарата; B — увеличение уровня ЗФ в процентах (A/B)100 в 10-минутном интервале (на сколько процентов уровень ЗФ увеличился через 10 мин после реакции клеток на Ацикловир); Г — коэффициент при « x » в уравнении линейной аппроксимации ЗФ в интервале после 20 мин с момента внесения Ацикловира (в интервале «медленного» восстановления). Как видно из табл. 4, максимальное отличие между повторами наблюдается в опыте № 1, а в дальнейших экспериментах между одновременными повторами минимальное.

Для штамма CALU 157 коэффициенты скорости изменения уровня ЗФ через 10 мин после добавки препарата (при линейной аппроксимации) составляют: 0,05; -0,26; 3,3; 3,25; 1,78; -0,11; 0,73; -0,78.

Отсутствие строго положительной или строго отрицательной динамики ЗФ у клеток штамма CALU 157 является принципиальным отличием от эндосимбиотического штамма NC64A.

Данные табл. 2 показывают, что штаммы NC64A и CALU 157 имеют различную динамику адаптации, которая выражается в положительной динамике ЗФ у штамма NC64A и отрицательной — у штамма CALU 157.

Реакция клеток на внесение токсического вещества (Ацикловир) также отличается. Клетки штамма NC64A чувствительнее к воздействию Ацикловира, чем клетки штамма CALU 157 (см. табл. 3).

Для штамма NC64A характерны два этапа восстановления, где значительный рост уровня ЗФ наблюдается в интервале от 10 до 20 мин после внесения Ацикловира. Второй этап восстановления наблюдается через 20 мин после внесения Ацикловира и характеризуется более медленным увеличением параметра ЗФ (см. табл. 4). Внесение препарата к суспензии хлорелл штамма CALU 157 не приводит к росту или падению уровня ЗФ.

Заключение

Эндосимбиотические водоросли штамма NC64A демонстрируют большую чувствительность к токсичному агенту, чем свободноживущие *Chlorella vulgaris*, о чем можно судить по динамике ЗФ. Использование эндосимбионтов в опытах по оценке содержания токсичных агентов в различных пробах может быть предпочтительнее, так как динамика ЗФ клеток в условиях прибора положительна, что делает эффекты токсичного агента почти в два раза контрастнее. Эндосимбиотические штаммы водорослей рода *Chlorella* могут быть предложены как альтернативный объект биотестирования. Как показали данные экспериментов, штамм *Chlorella variabilis* NC64A значительно чувствительнее к внешним воздействиям по сравнению со штаммом *Chlorella vulgaris* CALU 157.

Литература

1. Han Xu, Xiaoling M., Qingyu Wu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters // J. Biotechnol. 2006. Vol. 126. P. 499–507.
2. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula* / T. V. Luz, M. D. C. Claudia, M. R. Claudia, E. D. Luz, V. Yoav // Water Research. 2002. Vol. 36. P. 4185–4195.
3. Григорьев Ю. С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer): токсикологические методы анализа, 2004. М.: 2007. 37 с.
4. Григорьев Ю. С., Власова Е. С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции (ОПЗФ) культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer): токсикологические методы анализа. М., 2009.
5. Филенко О. Ф. Водная токсикология. М.: Изд-во Черноголовка, 1988. 156 с.
6. Жмур Н. С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. М.: Междунар. Дом Сотр., 1997. 116 с.
7. Популяционная изменчивость тройственной симбиотической системы: *Paramecium bursaria* — зоохлорелла — поражающие ее вирусы / К. В. Квитко, А. В. Мигунова, И. Н. Гапонова, К. П. Воробьев, М. А. Фирсов, М. С. Раутиан, Д. В. Карелов, Е. Е. Андронов. // Экол. генет. 2004. Т. 2, № 4. С. 29–39.
8. Van Etten J. L., Lane L. C., Meints R. H. Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae // Microbiol Rev. 1991. Vol. 55. P. 586–620.
9. Азеев В. А., Квитко К. В. Изучение *Chlorella* sp. и их вирусов как модельных объектов для тестирования противовирусных препаратов [Текст] = Studying of *chlorella* sp. and their viruses as a model system to test antiviral drugs // Матер. Моск. Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 15–17 марта, 2010 г.) / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева. М., 2010. С. 449–450.
10. Beijerinck M. W. Culturversuche mit Zoochlorella, Lichenengonidien und anderen niederen Algen // Bot. Zeit. 1921. N 2. S. 47.
11. Маторин Д. Н., Осипов В. А., Сейфуллина Н. Х. Усиление токсического действия метилртути на микроводоросли *Chlorella vulgaris* в условиях светового и холодового стресса // Микробиология. 2009. Т. 78, № 3. С. 362–368.
12. Влияние загрязнения воды нефтью на замедленную флуоресценцию водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer и выживаемость рачков *Daphnia magna* Str. / Т. С. Бородулина, В. И. Полонский,

Е. С. Власова, Т. Л. Шашкова, Ю. С. Григорьев // Сибирский экологический журнал. 2011. Т. 1. С. 107–111.

13. Рубин А. Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге [Электронный ресурс] // Русский переплет: Литературный интернет-журнал. URL: http://pereplet.ru/nauka/Spros/pdf/0004_007.pdf (дата обращения: 09.09.11).

14. Gromov B. V., Titova N. N. CALU-Collection of algal cultures in the laboratory of microbiology of Biological Institute of Sankt-Petersburg University // Catalogue of Microalgal Cultures in the Collections of the USSR / ed. by V. S. Semenco. Moscow: IPPAS, 1991. P. 76–125.

15. Pröschold T., Darienko T., Silva P.C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of Zoochlorella revisited employing an integrative approach // Environ Microbiol. 2011. Vol. 13(2). P. 350–364.

16. Мигунова А. В., Квитко К. В., Прокошева М. Ю., Литвинов Д. Б. Влияние температуры на размножение *P. bursaria*—*Chlorella*—PBCV-вирусов в системе тройного симбиоза // Вестн. С.-Петербург. ун-та. 2000. Сер. 3: Биология. Вып. 1. С. 65–75.

Статья поступила в редакцию 15 декабря 2011 г.