

УДК 574.64

Скріпник І. О., канд. біол. наук., ст. наук. сп.Одеський філіал Інституту біології південних морів НАНУ України,
вул. Пушкінська, 37, Одеса, 65011, Україна

ЦИТОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ПЕРІОДИЧНОГО ВПЛИВУ МІДІ НА ДІАТОМОВІ ВОДОРОСТІ

Екологічно вагомим за сучасного стану екосистеми північно-західної частини Чорного моря є забруднення локальних акваторій міддю. У лабораторних експериментах доведено різну динаміку дії CuSO_4 на діатомові водорості за первинного і повторного впливу. Цитохімічні дослідження показали, що біологічні ефекти міді обумовлюються як її вмістом у середовищі, так і фізіологічним станом клітин *Dytulium braytvelii* Grun., підданих впливу. Для оцінки фізіологічного стану клітин у досліджах застосовували комплекс методів аналітичної мікроскопії та вітальне забарвлення.

Ключові слова: мікрowodорості, мідь, фізіологічний статус клітин.

Сучасний стан екосистеми північно-західної частини Чорного моря характеризується стійким зниженням рівня антропогенних навантажень. Екологічно суттєвими факторами середовища, що визначають рівень продуктивності тотального фітопланктону і функціональну активність складаючих його класів мікрowodоростей, є біогенні речовини, які надходять в акваторію, і локальне забруднення металами, в основному міддю. Найбільш забрудненими є акваторії Одеської затоки і придунайський гирловий простір. Особливістю акваторії Одеської затоки є формування в літній період у придонному шарі дефіциту кисню на тлі відбудовних умов середовища. При цьому відзначається збільшення змісту зважених часток міді в поверхневому (кисневому) шарі, який виникає завдяки перепаду щільності водного середовища і перешкоджає седиментації зважених компонентів з адсорбованими на них металами, в тому числі і міді. Зрушення рівноваги між адсорбованими на зваженій речовині і донних відкладеннях формами токсикантів приводить до "вторинного" забруднення середовища [1]. Вивчення впливу міді на мікрowodорості обумовлено їх ключовою роллю в трофіці екосистем, а також достовірно встановленою здатністю міді в першу чергу впливати на водорості, гриби та безхребетних, що пояснюється відсутністю у цих організмів вироблених у процесі еволюції механізмів ізоляції, переносу та інших шляхів знешкодження міді в біологічних системах [2].

У проведених раніше дослідженнях щодо порівняльної чутливості мікрowodоростей до дії металів, і міді зокрема, показано, що найбільшою чутливістю до зазначених впливів володіють крупні форми діатомових водоростей [3]. У даній роботі розглядається вплив міді у складі CuSO_4 на чорноморську діатомову водорість *Dytulium braytvelii* Grun.

Матеріали й методи

Впливу розчинів CuSO_4 (з концентрацією Cu^{2+} 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) була піддана водорість *Dytulium braytvelii* у логарифмічній фазі росту. Водорість культивували на середовищі Гольдберга у 200 мл склянках Ерленмейера. Після 10 доби впливу зазначених концентрацій Cu^{2+} клітини пересаджували у чисте живильне середовище, на якому вони знаходилися три доби. Потім повторно вносили вище наведені концентрації міді. Умови досліду: світло: темрява 8:16 годин, освітленість — 4000 люкс, температура 16 - 18 °С. Рандомізацію дослідних склянок здійснювали методом латинського квадрату [4].

Враховували параметри, що добре віддзеркалюють реакції клітин на періодичний вплив CuSO_4 [5]. Визначали: загальну чисельність клітин — методом прямого підрахунку під мікроскопом в 0,1 мл. інкубаційного середовища; інтенсивність світлопропускання протоплазмою (%) — методом поляризаційної мікроскопії; суху вагу клітин, ядра й цитоплазми ($\text{г}\cdot 10^{-9}$) методом інтерференційної мікроскопії. За результатами прямого підрахунку кількості клітин розраховували питому швидкість їх росту [5]. Для вияву місць локалізації міді клітини зафарблювали діетилдитіокарбаматом. Розраховували також мітотичний індекс [6]. За порівняльної оцінки даних враховували результати, отримані на клітинах, що знаходилися в одній стадії мітотичного циклу. Синхронізацію поділу клітин не проводили. Фізіологічний статус клітин у пробі оцінювали по ступеню зв'язування вітальних барвників ядром і цитоплазмою. Фарбування клітин вітальними барвниками проводили в модифікації, запропонованій для діатомей [7].

Результати та їх обговорення

За первинного впливу міді у досліджуваному діапазоні її концентрацій спостерігається зниження питомої швидкості росту клітин на п'яту добу досліду у порівнянні з контролем. У різних варіантах цих дослідів питома швидкість росту клітин коливається в діапазоні величин 0,45 - 0,65. Мінімальна випробовувана концентрація (2,5 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) стимулює ріст клітин, так що вже на третю добу темп росту останніх у дослідних пробах дещо вищий, ніж у контролі, а на 10-й день значно перевищує його. За концентрації Cu^{2+} 5 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ швидкість росту клітин нижча контрольної на другу добу, ще більш низька на четверту, але на 10-й день досягає контрольних значень. Максимальний негативний вплив на темп росту клітин виявлено за концентрації Cu^{2+} 50 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (рис. 1).

Слід зазначити, що за первинного впливу міді виникають зміни ряду показників клітин — сухої ваги ядра і цитоплазми, світлопропускання цитоплазмою. Як дуже чутливу реакцію клітин, яка передуює іншим порушенням за впливу міді, слід зазначити збільшення сухої ваги ядер і падіння мітотичного індексу (рис. 2, 3). Зазначенні зміни описуються двофазною кривою залежності відповідної реакції на односпрямоване наростання концентрації міді, що узгоджується з класичною картиною відгуку на токсич-

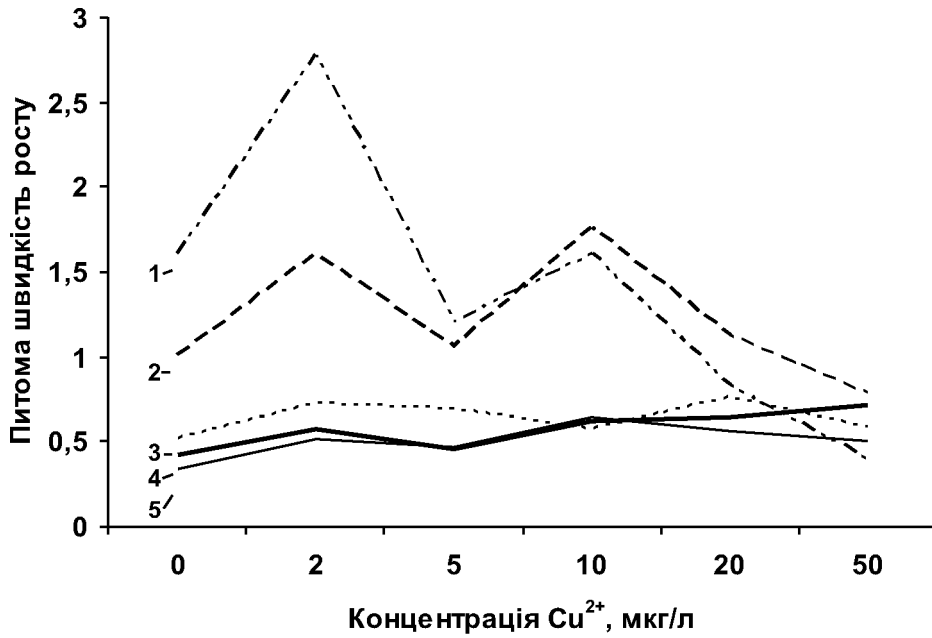


Рис.1. Питома швидкість росту клітин за дії різних концентрацій CuSO_4 при різній тривалості дослідження (днів):

1 — 10 днів; 2 — 7 днів; 3 — 5 днів; 4 — 1 доба; 5 — 3 доби

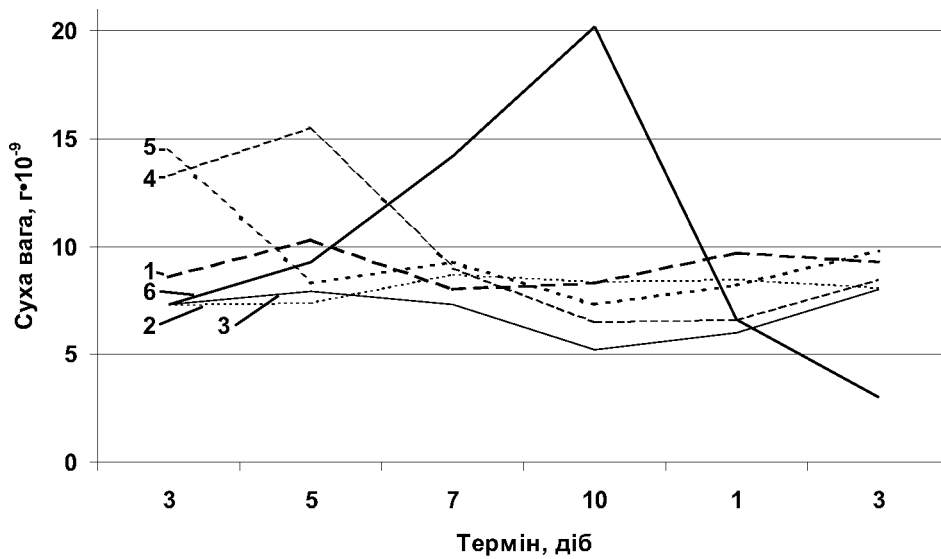
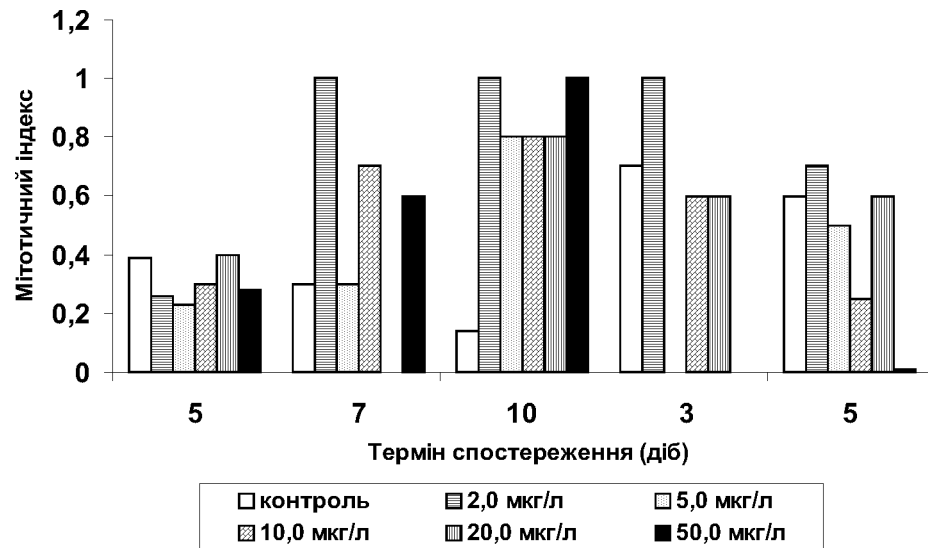


Рис. 2. Суша вага клітин за їх утримання у різних концентраціях CuSO_4 :

1 — контроль; 2 — 2 мкг·л⁻¹; 3 — 5 мкг·л⁻¹; 4 — 10 мкг·л⁻¹; 5 — 20 мкг·л⁻¹; 6 — 50 мкг·л⁻¹.

Рис. 3. Мітотичний індекс у клітин при дії досліджуваних концентрацій CuSO_4

ний вплив [5]. Отримані результати свідчать про неоднозначність реакції клітин на первинний і повторний вплив міді. За повторного впливу тих же концентрацій міді на водорості розвиток порушень виглядає дещо інакше. Спостерігається зсув фаз фізіологічної відповіді клітин на дію міді, і концентрації, які при первинному впливі викликають лише певні відхилення з боку клітини (зміну ядерно-плазменного співвідношення і мітотичного індексу), за повторного впливу можуть призводити до більш істотних порушень. Повторний вплив міді після триденного періоду відмивання клітин від попереднього забруднення призводить до незворотних ушкоджень клітин, особливо у варіантах досліду з концентраціями Cu^{2+} 10 і 20 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. На незворотність змін у клітинах вказує порушення вже на першу добу поведінки вітальних клітинних барвників і дифузне забарвлення ними ядра і цитоплазми, що є свідченням метаболічної пасивності і подальшої смерті клітин. Дійсно, вже на третю добу відбувається масова загибель клітин у середовищі, що містить 20 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ і більше міді. Цитохімічні дослідження показали, що характер сорбції міді клітиною визначається як її змістом у середовищі, так і фізіологічним статусом клітин, підданих впливу токсиканту. При низьких концентраціях міді вона в основному адсорбується на клітинних оболонках. У міру наростання концентрацій мідь проникає в клітину і відміщується у вигляді згустків у цитоплазмі. Проникнення міді в ядро спостерігається за високих її концентрацій і збігається з летальною дією. Цей факт є непрямим свідченням того, що летальна дія іонів міді обумовлена порушенням функцій ядерного апарату. Треба зазначити, що за по-

Цитологічні аспекти періодичного впливу міді на діатомові водорості

вторної дії міді на тлі зниженої відносної кількості живих і фізіологічно активних клітин концентрація міді, що призводить до летального ефекту, набагато менша, ніж за первинного впливу CuSO_4 .

Реакція клітин фітопланктону на первинний і повторний вплив міді повинна знайти серйозний розгляд у межах проблеми адаптації біоти до впливу металів. Цитоекологічний підхід дозволяє глибше розглянути проблему механізмів стійкості популяцій до таких впливів.

Література

1. Доценко С. А., Рясинцева Н. И., Савин П. Т., Саркісова С. А. Специфические черты гидрологического и гидрохимического режимов и уровень загрязнения прибрежной зоны моря в районе Одессы // Исследования шельфовой зоны Азово-Черноморского бассейна. — Севастополь: Из-во МГИ НАНУ, 1995. — С.31-43.
2. Эйхенбергер Э. Взаимосвязь между необходимостью и токсичностью металлов в водных экосистемах // Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. — М.: Мир, 1993. — С. 62-84.
3. Скрипник И. А. Сравнительная токсичность металлов для морских микроводорослей // Глобальная система наблюдений Черного моря: фундаментальные и прикладные аспекты. — Севастополь: Из-во МГИ НАНУ, 2001. — С.45-58.
4. Любицев А. А. Дисперсионный анализ в биологии. — М.: МГУ, 1986. — 200 с.
5. Александров В. Я. Реактивность клеток и белки. — Л.: Наука, 1985. — 317 с.
6. Бенекс Г. Применение интерференционной микроскопии для исследования биологических объектов // Введение в количественную цитохимию. — М.: Мир, 1969. — С. 70-91.
7. Пирс Э. Гистохимия. — М.: Мир, 1962. — С. 878-879.
8. Gallagher G. C. Patterns of cell viability in the diatom *Skeletonema costatum* in batchculture and in natural population // Estuaries. — 1984. — V.7, № 1. — P. 109-118.

Скрипник И. А.

Одесский филиал Института биологии южных морей НАН Украины,
ул. Пушкинская, 37, Одесса, 65011, Украина

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИ НА ДИАТОМОВЫЕ ВОДОРΟΣЛИ

Резюме

Экологически значимым при современном состоянии экосистемы северо-западной части Черного моря является загрязнение локальных акваторий медью. В лабораторных экспериментах показана разная динамика воздействия CuSO_4 на диатомеи при первичном и повторном воздействии. Цитохимические исследования показали, что экологические эффекты меди обусловлены как ее содержанием в среде, так и физиологическим статусом клеток *Dityulium braytvelii* Grun., подвергнутых воздействию CuSO_4 . Для оценки физиологического статуса клеток в опытах использованы методы аналитической микроскопии и витальное окрашивание.

Ключевые слова: микроводоросли, медь, физиологический статус клеток.

Scripnic I. O.

Odessa Branch, Institute of Biology of Southern Seas of Ukraine,
Pushkinskaya St., 37, Odessa, 65011, Ukraine

**CYTOLOGICAL ASPECTS OF PERIODIC COOPER INFLUENCE
ON THE DIATOM ALGAE**

Summary

There have been conducted the experiments on the algological pure culture *Dytulium braytvelii* Grun. being influenced by the periodic cooper action. The number of cells has been found out. Physiological status has been defined by the method of interferometer-polarized-light microscopy and staining with vital dyes. It was proved that ecological influence of cooper upon the diatom algae depends on both its environmental content and the physiological status of *Dytulium braytvelii* cells.

Key words: *Dytulium braytvelii*, cooper, physiological status of the cell.