

**ВЛИЯНИЕ ЛЕГКОЙ ФРАКЦИИ
НЕФТИ НА ДИНАМИКУ
ЧИСЛЕННОСТИ, СОДЕРЖАНИЕ
АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ
И АДЕНИЛАТНЫЙ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЗАРЯД
В КУЛЬТУРЕ МОРСКОЙ
ПЛАНКТОННОЙ ВОДОРОСЛИ
*Platymonas viridis.***

A.A. Сысоев, И.В. Сысоева

Институт биологии южных морей
НАН Украины
г. Севастополь, проспект Нахимова, 2
E-mail: alexsysoev@yandex.ru

*В статье рассматриваются особенности динамики численности клеток и аденилатного пула в культуре морской планктонной водоросли *Platymonas viridis* в зависимости от содержания нефтяного токсиканта – бензина Б-70. Приводится анализ изменений аденилатного энергетического заряда и внутриклеточного аденилатного пула в аспекте целесообразности энергетических затрат на адаптивные процессы.*

Введение. Одним из наиболее распространенных негативных антропогенных факторов является нефтяное загрязнение среды. Разливы нефти приносят наибольший ущерб экосистеме в краткосрочный начальный период, когда в составе нефти присутствуют в большом количестве наиболее токсичные легкие фракции.

При разработке проведения эксперимента основывались на соблюдении следующих критериев экологического мониторинга:

1. существование связи между выбранной переменной и такими показателями, как рост и воспроизведение популяции;
2. характер связи между наблюданной переменной и откликами на низших и высших уровнях организации;
3. специфичность отклика переменной к фактору, его вызывающему;
4. возможность возврата переменной к своему первоначальному значению после прекращения действия возмущающего фактора;
5. интенсивность действующего

фактора, вызывающего наблюдаемый отклик переменной;

6. пределы изменения величины действующего фактора, вызывающие наблюдаемый эффект;

7. величина отрезка времени, в течение которого формируется отклик;

8. легкость обнаружения превышения «сигнала» отклика над природным фоном («шумом»);

9. точность измерения наблюдаемого отклика переменной.

Одним из наиболее объективных показателей влияния токсикантов на жизнедеятельность организмов является оценка физиологического состояния клеток по аденилатному энергетическому заряду Аткинсона.

Определено, что рост и деление клеток, а также протекание внутриклеточных метаболических процессов, прямо или косвенно, зависят от доступности энергии аденилатного пула [1]. Модель Аткинсона основана на связи между содержанием адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), клеточными метаболическими процессами и внутриклеточной энергией биохимического потенциала (макроэргические фосфатные связи). Определяющим началом этой связи служит аденилатный энергетический заряд (АЭЗ), который вычисляется из молярных концентраций по формуле:

$$AEZ = (ATF + 1/2ADF) / (ATF + ADF + AMF).$$

Теоретически, значения АЭЗ могут приобретать значения от 0 (полностью разряженная система, состоящая только из АМФ) до 1 (полностью заряженная система, состоящая только из АТФ). В действительности, при метаболическом гомеостазе, АЭЗ колеблется в узком диапазоне (0,75 – 0,98) [2]. Было показано, что для клеточного деления необходимы значения АЭЗ 0,8 – 0,9 [3]. К тому же, в диапазоне значений АЭЗ 0,4 – 0,8 находятся критические точки ингибирования анаболических энзимов. В результате многочисленных исследований, были разработаны следующие критерии оценки физиологического состояния одноклеточных по АЭЗ:

– заряд от 0,75 и выше свидетельствует о полном метаболическом гомео-

стазе, при котором все жизненные функции и способность к размножению ничем не ограничены;

– АЭЗ в пределах 0,5 – 0,75 характерен при умеренной степени метаболической депрессии. В этом случае временно нарушены некоторые жизненные функции, связанные с ростом и размножением, но при восстановлении АЭЗ до 0,75 и выше, все жизненные функции восстанавливаются;

– значения АЭЗ ниже 0,5 указывают на сублетальную степень физиологического угнетения [2, 4].

Наш выбор по изучению динамики аденилатов, АЭЗ и численности клеток обусловлен целью составить представления об изменениях физиологического состояния планктонных водорослей при воздействии различных концентраций легких фракций нефти, на примере культуры морской планктонной водоросли *Platymonas viridis* – вида, наиболее устойчивого к негативным факторам среды.

Условия эксперимента. Работу проводили, используя три варианта условий содержания культуры *Platymonas viridis*:

- 1) на среде Гольдберга (контроль);
- 2) на среде Гольдберга с добавлением бензина Б-70 (концентрация 10 мкл/л) – (А);

- 3) на среде Гольдберга с добавлением бензина Б-70 (концентрация 50 мкл/л) – (Б).

Весь комплекс работ проведен в летнее время, при температуре 23 – 25 °C.

Пробы для контроля численности клеток и для аденилатного анализа отбирали через каждые трое суток: 1-е (стартовые величины параметров, общие для всех вариантов содержания), 4-е, 7-е и 10-е.

Для счета клеток и определения аденилатного пула использовали методы, приведенные в [5].

Основные результаты.

Динамика численности клеток. В контрольном варианте эксперимента наблюдался активный прирост численности клеток, в результате 10-дневной экспозиции численность увеличилась на величину порядка (рис. 1). Значительно меньший прирост отмечен в среде с бензином, вариант А: в результате полной экспозиции численность едва приблизилась к трехкратному значению от стартовой, причем основной прирост произошел в период от 7-х до 10-х суток. В среде с бензином, вариант Б, роста численности до 7-х суток вообще не прослеживалось, конечная численность в результате 10-дневной экспозиции приближалась к полуторакратной от стартовой.

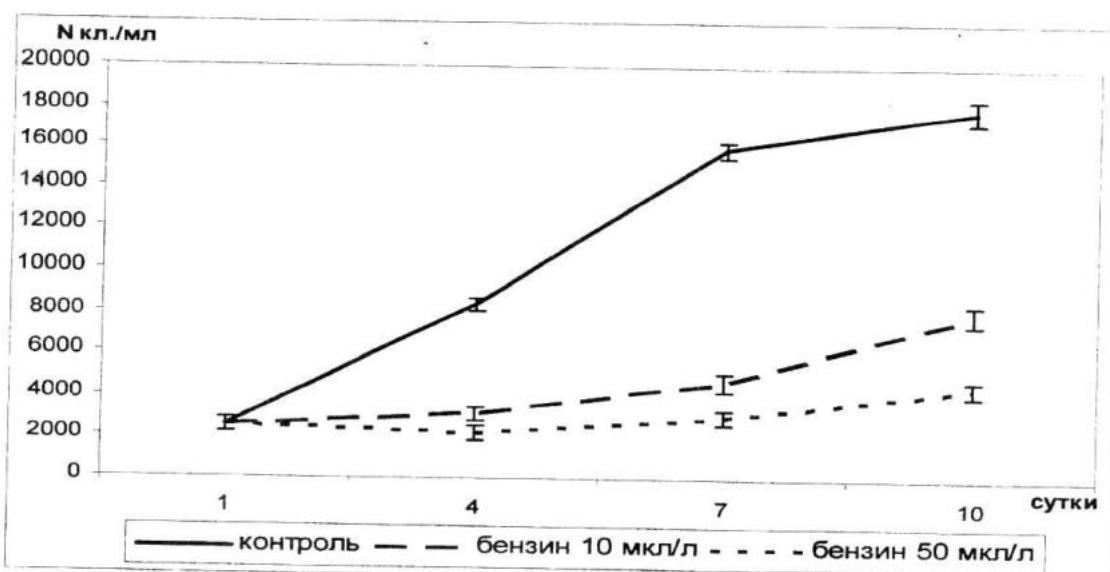


Рис. 1. Динамика численности клеток *Platymonas viridis* под воздействием бензина Б-70

Судя по динамике численности, в среде с бензином (А) основной адаптационный период занял не менее 7 суток, в среде с бензином (Б) отсутствие ощущимого прогресса увеличения численности указывает на то, что адаптационный период не завершился в рамках времени, отведенного на эксперимент.

Динамика содержания адениновых нуклеотидов и АЭЗ. Динамика адениновых нуклеотидов в контролльном варианте эксперимента отражена на рис. 2. Относительно пропорциональное повышение концентраций аденилатов, адекватное росту численности клеток отслежено на протяжении всего эксперимента. Везде отмечено значительное преобладание АТФ, доля АДФ занимала вторую пози-

цию, АМФ имело наименьшие показатели. На 10-е сутки экспозиции заметно прибавилась доля АМФ. Его концентрация почти достигла уровня АДФ. Вероятно, это связано с приближением к критической численности и снижением активности деления клеток.

В контролльном варианте эксперимента АЭЗ основательно возрос в первой фазе эксперимента, затем снизился до размера стартового, по мере возрастания численности. Причина снижения АЭЗ, очевидно, в энергетических тратах на репродукцию клеток. Можно предположить, что величина АЭЗ и в дальнейшем должна снижаться, понижая тем самым скорость деления клеток при достижении определенного максимума.

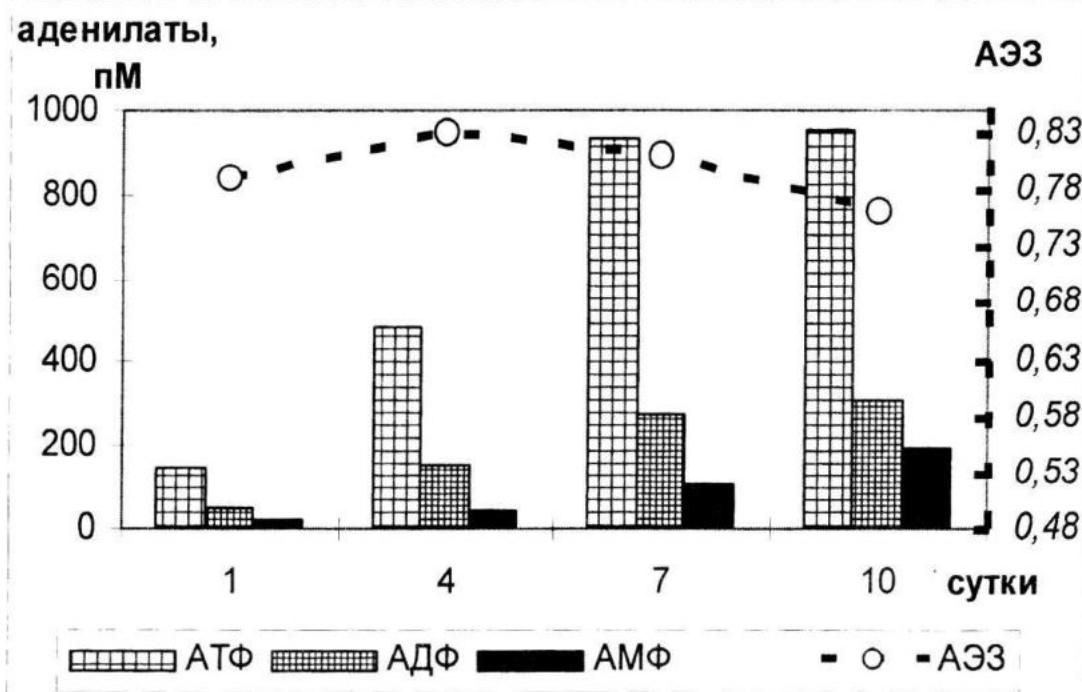


Рис. 2. Динамика концентраций адениновых нуклеотидов и АЭЗ в культуре *Platymonas viridis* на среде Гольдберга

Динамика аденилатов и АЭЗ в варианте А эксперимента отражена на рис. 3. В сравнении с контролльным вариантом отмечено значительное снижение скорости синтеза аденилатов, согласующееся с динамикой численности клеток. На 4-е сутки экспозиции содержание АТФ было ниже, чем АДФ. Из этого можно предположить, что на первом этапе эксперимента главные энергетические траты

были направлены на адаптационные механизмы клеток против негативного влияния токсиканта. В последующем, доминирующее положение АТФ в аденилатном пуле постепенно выправилось, что отразилось на возрастании активности деления клеток (рис. 1). В среде с бензином (А) наблюдался резкий спад АЭЗ в первой фазе, затем постепенный рост с достижением величины, близкой к

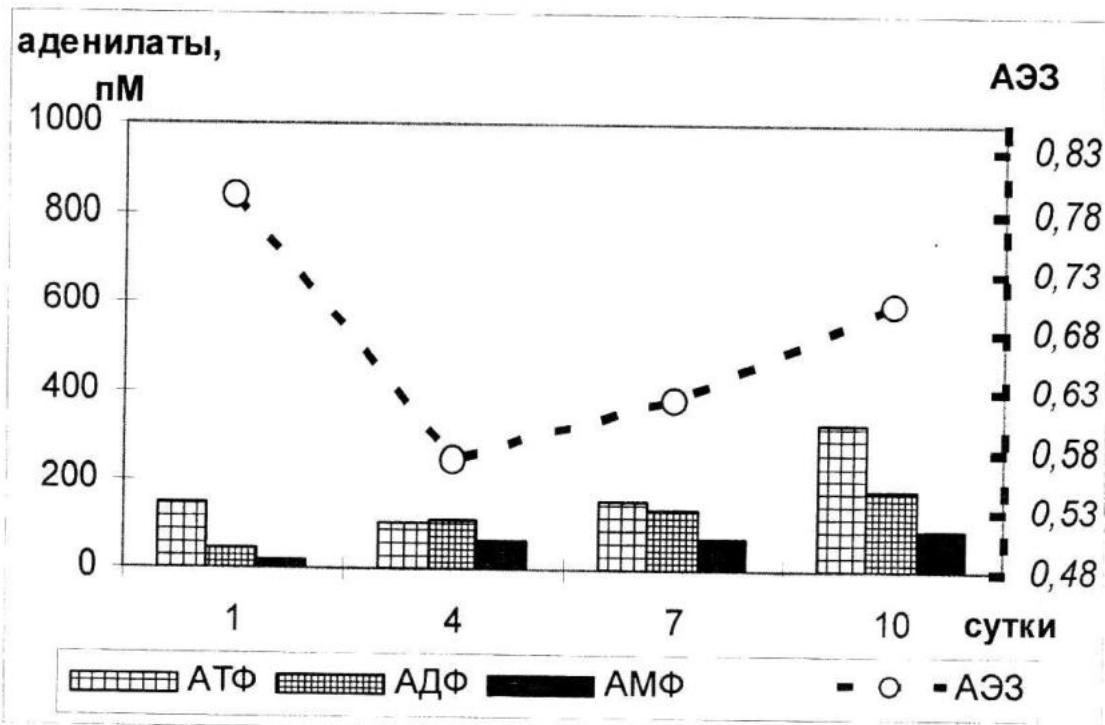


Рис. 3. Динамика концентраций адениновых нуклеотидов и АЭЗ в культуре *Platymonas viridis* на среде Гольдберга, с добавлением бензина Б-70 (вариант А)

фазе активного роста численности популяции. Есть основания предположить, что с повышением АЭЗ до значений ак-

тивного роста популяции темпы деления клеток возрастут.

Динамика аденилатов и АЭЗ в вари-

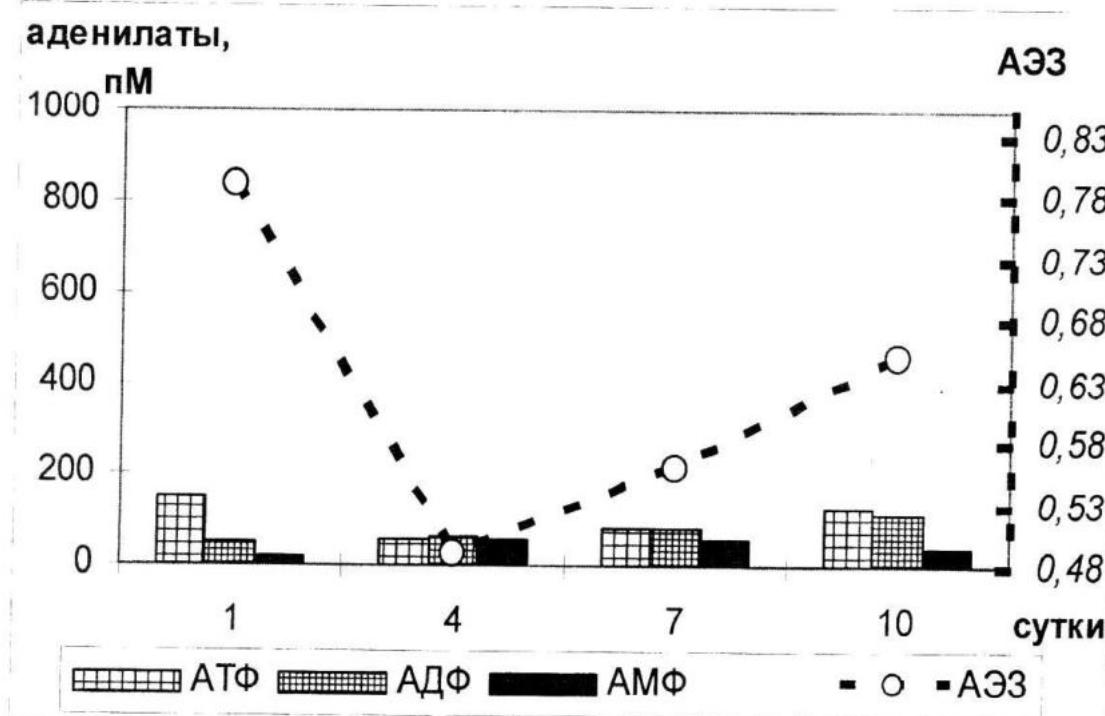


Рис. 4. Динамика концентраций адениновых нуклеотидов и АЭЗ в культуре *Platymonas viridis* на среде Гольдберга, с добавлением бензина Б-70 (вариант Б)

анте Б эксперимента отражена на рис. 4.

В начальной фазе эксперимента, на 4-е сутки содержание АТФ было ниже, чем других аденилатов. Это свидетельствует о значительных энергопотерях от воздействия токсиканта. Негативное действие бензина на АЭЗ было выражено наиболее сильно. В первой фазе эксперимента АЭЗ снизился до значений латентной активности аденилатной энергетической системы, что нашло отражение и в некотором снижении численности клеток (рис. 1). В дальнейшем была прослежена тенденция к восстановлению эффективного соотношения адени-

латов, но, вероятно, от гораздо большей концентрации бензина, адаптационные процессы растянулись на более продолжительный срок. В заключительной фазе эксперимента, на 10-е сутки экспозиции схожее соотношение аденилатов в варианте А отмечено на 7-е сутки, но даже по завершению эксперимента его величина не достигла значения активной фазы роста. Очевидно, адаптационный период не завершился в период эксперимента.

Динамика соотношений аденилатного пула и численности клеток имела следующие особенности (рис. 5).

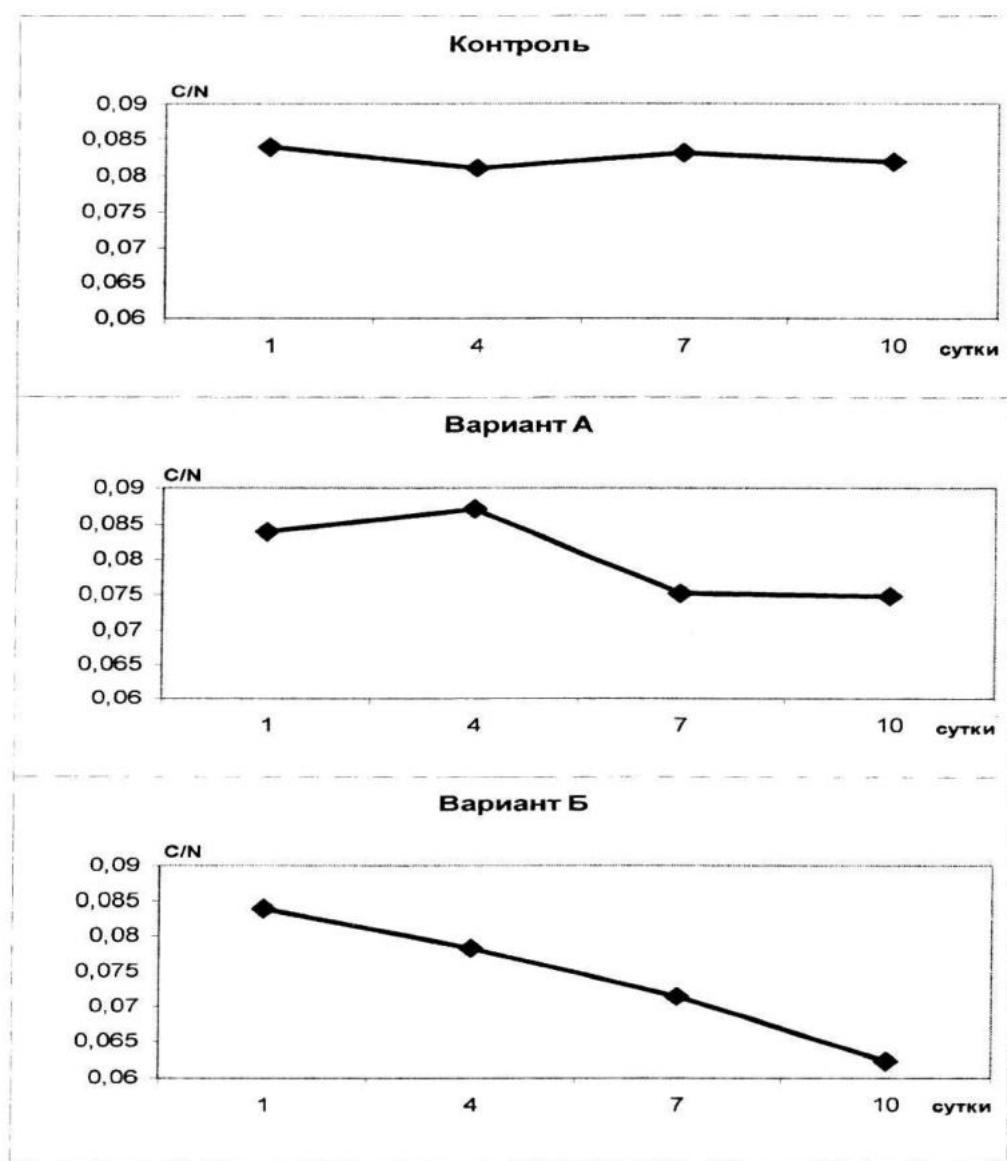


Рис. 5. Динамика соотношений концентраций аденилатного пула (C , пМ/л) и численности клеток (N , кл./мл) в культуре *Platymonas viridis* на среде Гольдберга (контроль), с добавлением бензина Б-70: с концентрацией 10 мкл/л (вариант А) и с концентрацией 50 мкл/л (вариант Б)

В контроле не было отмечено значительных колебаний величин на протяжение всего экспериментального периода (рис. 5, Контроль). Это свидетельствует о физиологическом гомеостазе, несмотря на значительные энергетические затраты в процессе активного деления клеток. При росте численности почти на величину порядка в течение 10 суток (рис. 1), сохранявшийся высоким АЭЗ на протяжении эксперимента (рис. 2) и стабильное соотношение аденилатного пула с численностью клеток, дают основание для утверждения о высоком производственном потенциале культуры при заданных контрольных условиях.

В среде с добавлением бензина Б-70 с концентрацией 10 мкл/л динамика соотношений аденилатного пула и численности клеток имела следующие особенности. На четвертые сутки отмечено значительное повышение аденилатного пула (рис. 5, Вариант А) при резком снижении АЭЗ (рис. 3). В этом проявляется такой тип стратегии биохимических адаптаций, при котором возрастают концентрации макромолекул для активного противодействия негативному влиянию токсиканта [6]. Подобная реакция – процесс, направленный, как правило, на длительный период адаптации. Значительная часть синтезированной и потраченной энергии, вероятно, была направлена на активный вывод токсиканта из клетки. В дальнейшем, начиная с 7-х суток, удельный клеточный аденилатный пул заметно снизился, в то время как АЭЗ значительно возрос (рис. 3), что указывает на компенсаторную реакцию экстренной зарядки аденилатной системы, необходимой для протекания процессов метabolизма. Подобная тенденция прослеживается и в дальнейшем, вплоть до окончания эксперимента.

В среде с добавлением бензина Б-70 с концентрацией 50 мкл/л динамика соотношений аденилатного пула и численности клеток имела следующие особенности (рис. 5, Вариант Б). На протяжении всего эксперимента наблюдали снижение удельного клеточного аденилатного пула. Несмотря на то, что АЭЗ после четвертого дня эксперимента показал значительный рост, приближаясь на десятые сутки к значениям, близким к ор-

динарным (рис. 4), снижение пула происходило в прежнем режиме. Это свидетельствует о том, что угнетение токсикантом аденилатной энергетической системы оставалось существенным, поскольку для повышения АЭЗ в системе по-прежнему сокращалось количество адениновых оснований, действовавших во внутриклеточной энергетике.

Таким образом, результаты работы, проведенной с культурой *Platymonas viridis*, наглядно продемонстрировали четкую взаимосвязь между физиологическим состоянием клеток, определяемым аденилатным энергетическим зарядом и репродукционной активностью популяции, а также обозначили сроки адаптационного периода, в зависимости от концентраций токсиканта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atkinson D.E. Adenine nucleotides as universal stoichiometric metabolic coupling agents // Advances in enzyme regulations, edited by G. Weber Academic Press – 1971. – New York. – P. 207 – 219.
2. Chapman A.G., Fall L., Atkinson D.E. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation // J. Bacteriol. – 1971. – 108. – N 3. – P. 1072 – 1086.
3. Swedes J.S., Sedo R.J., Atkinson D.E. Relation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine-requiring mutant of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 1975. – 250. – P. 6930 – 6938.
4. Livingstone D.R. General biochemical indices of sublethal stress // Mar. Pol. Bull. – 1982. – 13. – N 8. – P. 261–263.
5. Сысоева И.В., Сысоев А.А.. Динамика биохимических параметров микропланктона и ее связь с адаптационными процессами// Микроводоросли Черного моря: проблемы биоразнообразия, сохранения и биотехнологического использования. Монография. Глава 17. – Севастополь. – 2008. – С. 430-447.
6. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимических адаптаций. – М. – Мир. – 1977. – С.398.