

# ИЗМЕНЧИВОСТЬ флуоресценции ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ВОДОРОСЛИ *CONTICRIBRA WEISSFLOGII* при осмотическом СТРЕССЕ

У диатомовой водоросли *Conticribra weissflogii*, акклиматизированной к солености 17,5 ‰ оценивали относительную переменную флуоресценции отдельных клеток ( $F_v^*/F_m^*$ ) после пересева на среды с соленостью 8,8 ‰ (гипоосмотические условия), 35 ‰ (гиперосмотические условия) и 17,5 ‰ (контроль). Как в гипо-, так и в гиперосмотических условиях в первые 2–4 ч возрастала доля нежизнеспособных клеток, доля клеток с максимальной  $F_v^*/F_m^*$  снижалась, вариабельность клеток по  $F_v^*/F_m^*$  была наибольшей. Через сутки доля нежизнеспособных клеток снизилась, доля клеток с максимальной  $F_v^*/F_m^*$  увеличилась, вариабельность клеток по  $F_v^*/F_m^*$  снизилась.



## Введение

Стресс определяют как изменение условий роста, ведущее к нарушению гомеостаза клеточного метаболизма и вызывающее перестройку процессов метаболизма, называемую акклимацией [1]. У фотоавтотрофных организмов наиболее чувствительным сенсором стресса выступают хлоропласты [2]. Одним из показателей состояния фотосинтетического аппарата является величина относительной переменной флуоресценции ( $F_v^*/F_m^*$ ). Способность популяции акклиматизироваться к стрессу и, в конечном счете, выживать в изменяющихся экологических условиях в значительной мере определяется внутривидовой гетерогенностью, т.е. различием особей в пределах одной популяции. И если внутривидовой изменчивости животных и высших растений посвящено зна-

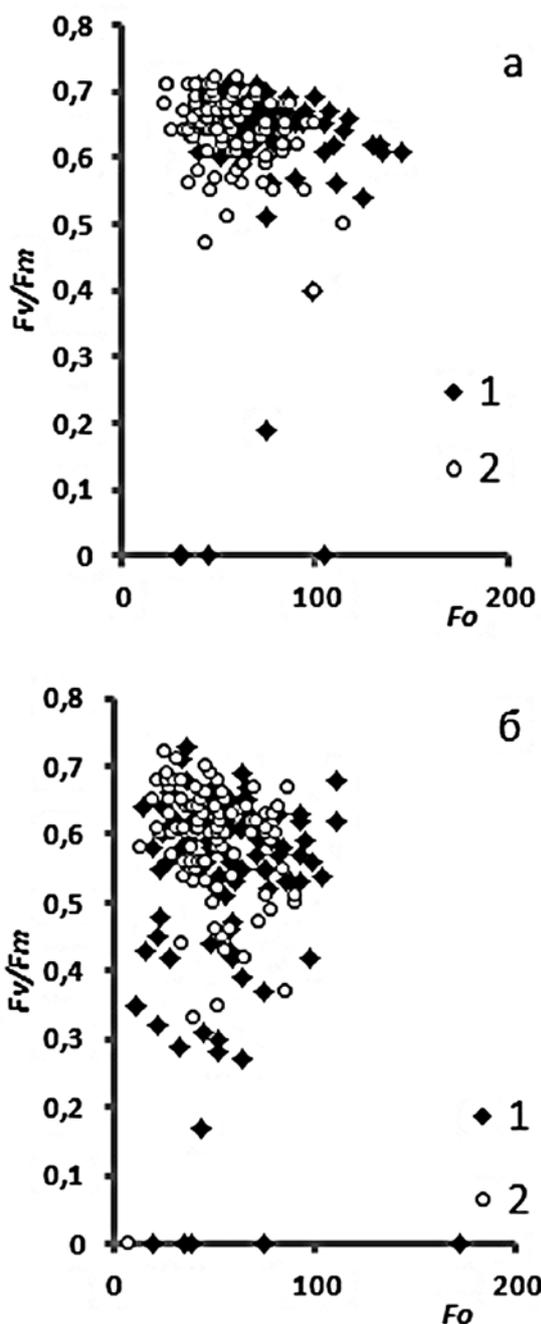
**В.А. Курочкина**, аспирант биологического факультета, ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

**Т.А. Белевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник биологического факультета, ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

чительное число работ, то сведения о гетерогенности популяций микроводорослей крайне малочисленны. Лишь в последнее десятилетие с развитием новых методов было показано, что в пределах одной популяции клетки различаются по содержанию фотосинтетических пигментов [3] и биогенных элементов [4], биохимическому составу [5], параметрам флуоресценции [6-8].

Соленость является одним из основных факторов, влияющих на фотосинтетическую активность (ФА) микроводорослей, особенно в эстуарных экосистемах и ледовых биотопах. Водоросли различаются по диапазону солености, к которому они могут акклиматизироваться, а также по диапазону оптимальной солености, при котором достигается максимальная скорость роста [9]. Как снижение солености среды по сравнению с оптимальной (гипоосмотический стресс), так и увеличение (гиперосмотический стресс) вызывают изменение скорости роста популяции [10-12], фотосинтетической фиксации углерода [13], содержания

\*Адрес для корреспонденции: [ilyashl@mail.ru](mailto:ilyashl@mail.ru)



**Рис. 1.** Величины  $F_v^u/F_m^u$  в контрольных культурах в экспериментах по повышению (а) и понижению (б) солености через 2 ч (1) и 24 ч (2) после пересева.

фотосинтетических пигментов [12], скорости потребления биогенных элементов [10, 11]. Все эти параметры представляют собой усредненные значения для популяции, тогда как сведения по изменчивости функциональных параметров отдельных клеток в популяции в ответ на осмотический стресс отсутствуют.

В настоящей работе представлены данные о вариабельности относительной переменной флуоресценции отдельных клеток в популяции диатомовой водоросли *Conticribra weissflogii* при акклимации к гипо- и гиперосмотическому стрессу.

## Материалы и методы исследования

Материалом послужила альгологически чистая культура диатомовой водоросли *Conticribra weissflogii* (Grunow) Stachura-Suchoples et Williams (синоним *Thalassiosira weissflogii* Grunow). Эта водоросль отмечается как в морских [14], так и пресных водах [15]. В течение нескольких месяцев водоросли акклимировали к солености 17,5 ‰ путем многократных пересевов на среду, приготовленную на основе искусственной морской воды (солевая смесь фирмы «SERA») и обогащенную биогенными элементами по прописи среды f/2 [16].

Проведено две серии экспериментов — на снижение солености (эксперимент I) и повышение солености (эксперимент II) по сравнению с уровнем 17,5 ‰. Водоросли из культур на экспоненциальной стадии роста высевали на среды с соленостью 17,5 ‰ (контроль), 8,8 ‰ (гипосмотические условия) или 35 ‰ (гиперосмотические условия). При этом добавки биогенных элементов не вносили. Водоросли росли при температуре 20 °С, освещенности 75 мкЕ/(м<sup>2</sup>·с) и продолжительности светового периода 14 ч. Через 2, 4, 6 и 24 ч в каждой культуре измеряли параметры флуоресценции после 15-ти минутного выдерживания водорослей в темноте. У отдельных клеток водорослей при помощи переоборудованного флуоресцентного микроскопа «ЛЮМАМ ИЗ» по ранее описанной методике [6] оценивали флуоресценцию при открытых ( $F_o^u$ ) и закрытых ( $F_m^u$ ) реакционных центрах и рассчитывали относительную переменную флуоресценцию  $F_v^u/F_m^u = (F_m^u - F_o^u)/F_m^u$ . При каждом измерении выборка составляла 100 клеток.

Величины  $F_v^u/F_m^u$  изменяются от 0 до 0,72 [6]. Высокие значения характерны для водорослей в хорошем физиологическом состоянии, тогда как низкие свидетельствуют о состоянии стресса. Клетки с  $F_v^u/F_m^u < 0,1$  являются фотосинтетически неактивными и нежизнеспособными [17, 18]. Учитывая литературные данные [6, 17, 18], далее по тексту принимали следующее ранжирование ФА по величинам  $F_v^u/F_m^u$ :  $< 0,1$  — фотосинтетически неактивные клет-

**Таблица 1**

Средние значения относительной переменной флуоресценции отдельных клеток ( $F_v^n/F_m^n$ ), коэффициент вариации  $F_v^n/F_m^n$  (CV, %), достоверность различий средних значений  $F_v^n/F_m^n$  ( $P_{cp}$ ) и CV ( $P_{cv}$ ) в культурах, росших при солености 8,8 ‰ и 17,5 ‰ в эксперименте по снижению солености (эксперимент I) и при солености 35 ‰ и 17,5 ‰ в эксперименте по повышению солености (эксперимент II)

Время, ч	Эксперимент I						Эксперимент II					
	$F_v^n/F_m^n$			CV			$F_v^n/F_m^n$			CV		
	8,8 ‰	17,5 ‰	$P_{cp}$	8,8 ‰	17,5 ‰	$P_{cv}$	35 ‰	17,5 ‰	$P_{cp}$	35 ‰	17,5 ‰	$P_{cv}$
2	0,58	0,60	0,71	36	27	0,11	0,47	0,52	0,02	39	31	0,37
4	0,57	0,60	0,09	38	22	0,03	0,50	0,52	0,03	32	36	0,61
6	0,56	0,63	0,27	40	18	0,10	0,53	0,56	0,001	29	29	0,13
24	0,63	0,64	0,46	16	9	0,33	0,59	0,58	0,003	23	17	0,63

ки; 0,1–0,29 – низкая; 0,30–0,49 – средняя; 0,50–0,59 – высокая;  $\geq 0,60$  – максимальная ФА.

Для сравнения степени варьирования  $F_v^n/F_m^n$  во времени и в популяциях, росших при разной солености, использовали коэффициент вариации CV. Достоверность различий CV ( $P_{cv}$ ) оценивали по критерию Флайгнера-Киллена (Fligner-Killeen Test), а достоверность различий средних значений  $F_v^n/F_m^n$  ( $P_{cp}$ ) – по критерию Манна-Уитни с использованием программы PAST (PAleontological STatistics) Version 2.04 [19].

## Результаты и их обсуждение

В контрольных культурах в экспериментах по снижению и увеличению солености отмечена вариабельность клеток по  $F_v^n/F_m^n$  (рис. 1). Средние значения  $F_v^n/F_m^n$  достоверно возросли через 6 ч роста (табл. 1) как в эксперименте I ( $P_{cp} = 0,0009$ ), так и эксперименте II ( $P_{cp} = 0,003$ ). Нежизнеспособные клетки отмечены через 2 ч после пересева, по мере роста их доля снижалась, а доля клеток с максимальной фотосинтетической активностью возрастала (табл. 2, 3).

У водорослей в гипоосмотических условиях средние значения  $F_v^n/F_m^n$  достоверно не отличались от контроля (табл. 1). Однако распределение клеток по  $F_v^n/F_m^n$  в популяции, росшей при 8,8 ‰ отличалось от такового в контроле (табл. 2). Через 4 ч степень вариабельности достоверно превышала таковую в контроле, доля клеток с максимальными значениями  $F_v^n/F_m^n$  снизилась, а доля нежизнеспособных клеток увеличилась по

**С.И. Погосян**, доктор биологических наук, профессор биологического факультета, ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

**Л.В. Ильяш\***, доктор биологических наук, профессор биологического факультета, ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

сравнению с контролем. Через сутки распределение клеток стало таким же, как и в контроле. В течение суток степень варьирования  $F_v^n/F_m^n$  в гипоосмотических условиях достоверно снизилась ( $P_{cv} = 0,03$ ), что обусловлено снижением доли нежизнеспособных клеток. Увеличение среднего значения  $F_v^n/F_m^n$  оказалось недостоверным.

У водорослей в гиперосмотических условиях средние значения  $F_v^n/F_m^n$  были достоверно ниже контроля в течение, по крайней мере, 6 ч (табл. 1). Уже в первые 2 ч возросла доля нежизнеспособных клеток и клеток со средней ФА (табл. 3). При разном распределении клеток по  $F_v^n/F_m^n$  в популяциях, росших при 35 ‰ и 17,5 ‰, степень варьирования  $F_v^n/F_m^n$  достоверно не различалась. Степень варьирования  $F_v^n/F_m^n$  в гиперосмотических условиях через 6 ч достоверно снизилась ( $P_{cv} = 0,009$ ). Более высокие средние значения  $F_v^n/F_m^n$  через 24 ч в гиперосмотических условиях обусловлены более высокой по сравнению с контролем долей клеток с максимальной ФА.

Гетерогенность популяций *C. weissflogii* по  $F_v^n/F_m^n$  выявлена как в условиях осмотического стресса, так и в его отсутствие. В контрольных популяциях, не испытывающих осмотический стресс, присутствовали нежизнеспособные клетки. Доля нежизнеспособных клеток не превышала 5 %, что соответствует доли мертвых клеток в активно растущих культурах других водорослей [20].

В условиях гиперосмотического стресса доля нежизнеспособных клеток возрастала уже в первые 2 ч, доля клеток с высокой и максимальной ФА снижалась. Все это свидетельствует о нарушениях

в работе фотосинтетического аппарата. Гиперосмотический стресс вызывает у диатомовых водорослей повышенное образование активных форм кислорода (АФК), которое уже не может быть нейтрализовано антиоксидантной клеточной системой [21]. Избыточное количество АФК окисляет пигменты, белки, а также тилакоидные мембраны, что ведет к снижению ФА [22]. Помимо этого АФК окисляют липиды, что обуславливает увеличение проницаемости клеточных мембран [21]. Нарушение проницаемости мембран является первой стадией в процессе отмирания водорослей, за ней следуют деградация фотосинтетических пигментов, фрагментация ядерной ДНК и лизис клеток [20].

Данные о том, что гипоосмотический стресс вызывает у диатомей образование избыточного количества АФК, отсутствуют. Повышенное образование АФК в гипоосмотических условиях показано для планктонной зеленой водоросли *Dunaliella salina* [23] и макроводорослей [24]. Учитывая этот факт, а также то, что у растений при большинстве абиотических стрессов именно АФК вызы-

вают повреждения клеточных структур [25], можно полагать, что у диатомей в гипоосмотических условиях также происходит повреждение фотосинтетического аппарата АФК. Об этом свидетельствует возрастание доли нежизнеспособных клеток и снижение доли клеток с максимальной ФА. Однако негативное влияние гипоосмотического стресса выражено в меньшей степени, чем гиперосмотического. Об этом косвенно свидетельствует тот факт, что хотя средние для популяции значения  $F_v^n/F_m^n$  при снижении солености были меньше таковых в контроле, но эти отличия оказались статистически не достоверными. Различия в степени негативного влияния гипо- и гиперосмотического стресса могут быть обусловлены разнонаправленностью метаболических механизмов акклимации к снижению и повышению солености. При повышении солености в клетках идет синтез осмолитов — метаболически инертных веществ с выраженным осмотическим действием. У диатомей основным осмолитом является пролин [9]. Повреждение фотосинтетического аппарата при гиперосмотическом стрессе снизит скорость синтеза осмолитов и, соответственно, скорость акклимации водорослей. При снижении солености в клетках происходит расщепление осмолитов до промежуточных продуктов, которые могут использоваться в клеточном метаболизме, в частности для образования АТФ в результате окислительного фосфорилирования [26]. Наличие такого «дополнительного» источника промежуточных продуктов и энергии, по-видимому, в определенной степени компенсирует снижение ФА. Меньшее негативное влияние гипоосмотического стресса по сравнению с гиперосмотическим было показано ранее для ледовых диатомовых водорослей [7].

Гетерогенность популяций по  $F_v^n/F_m^n$  может быть обусловлена генотипической неоднородностью популяции, которая выявлена у планктонных водорослей [27, 28]. Внутрипопуляционную вариабельность таких параметров как размеры клеток, скорость роста [27], устойчивость к токсикантам [29] связывают именно с различием клеток по генотипу. Не следует также исключать, что вариабельность  $F_v^n/F_m^n$  в условиях осмотического стресса может быть обусловлена также вариабельностью экспрессии генов в отдельных клетках [30]. В процессе акклимации вариабельность клеток по  $F_v^n/F_m^n$  снижается, т.е. гетерогенность популяции в большей степени проявляется в условиях стресса.

**Таблица 2**

**Доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценцией ( $F_v^n/F_m^n$ ) в культурах, росших 4 и 24 ч при солености 8,8 ‰ и 17,5 ‰. Эксперимент I**

$F_v^n/F_m^n$	4 ч		24 ч	
	8,8 ‰	17,5 ‰	8,8 ‰	17,5 ‰
<0,1	12	4	2	0
0,1-0,29	1	0	0	0
0,3-0,49	1	5	0	2
0,5-0,59	11	9	14	16
>0,6	75	82	84	82

**Таблица 3**

**Доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценцией ( $F_v^n/F_m^n$ ) в культурах, росших 2 и 24 ч при солености 35 ‰ и 17,5 ‰. Эксперимент II**

$F_v^n/F_m^n$	2 ч		24 ч	
	35 ‰	17,5 ‰	35 ‰	17,5 ‰
<0,1	9	5	3	1
0,1-0,29	1	4	2	0
0,3-0,49	31	18	6	11
0,5-0,59	30	36	18	28
>0,6	29	37	71	60



## Заключение

**У** диатомовой водоросли *C. weissflogii* в пределах одной популяции клетки различаются по способности акклиматизироваться к осмотическому стрессу — ФА у одних клеток остается на максимальном уровне, тогда как у других проявляются нарушения в работе фотосинтетического аппарата, одни клетки акклимируются быстрее, другие — медленнее.

## Литература

1. Shulaev V. Metabolomics for plant stress response / V. Shulaev, D. Cortes, G. Miller, R. Mittler // *Physiol. Plantarum*. 2008. V. 132. P. 1998-2008.
2. Biswal B. Photosynthesis under stress: stress signals and adaptive response of chloroplasts / B. Biswal, U.C. Biswal // *Handbook of Plant and Crop Stress* / Ed. M. Pessarakli. New York, Marcel Dekker Inc. 1999. P. 315-336.
3. Heraud P. Probing the influence of the environment on microalgae using infrared and Raman spectroscopy / P. Heraud, B. Wood, J. Beardall, D. McNaughton // *New Approaches in Biomedical Spectroscopy* / Eds K. Kneipp, R. Aroca, H. Kneipp, E. Wentrup-Byrne., Washington, ACS Books. 2007. P. 85-106.
4. Bucci V. Microscale patchiness leads to large and important intraspecific internal nutrient heterogeneity in phytoplankton / V. Bucci, D. Nunez-Milland, D.S. Twining, F.L. Hellweger // *Aquat. Ecol.* 2012. V. 46. P. 101-118.
5. Heraud P. Intercolonial variability in macromolecular composition in P-starved and P-replete *Scenedesmus* population revealed by infrared microspectroscopy / P. Heraud, S. Stojkovic, J. Beardall, D. McNaughton, B.R. Wood // *J. Phycol.* 2008. V. 44. P. 1335-1339.
6. Воронова Е.Н. Внутрипопуляционная гетерогенность параметров флуоресценции у морской планктонной водоросли *Thalassiosira weissflogii* при разной обеспеченности азотом / Е.Н. Воронова, Л.В. Ильяш, С.И. Погосян, А.Ю. Уланова, Д.Н. Маторин, Хо Ман-ги, А.Б. Рубин // *Микробиология*. 2009. Т. 78. С. 469-478.
7. Ryan K.G. Acclimation of Antarctic bottom-ice algal communities to lowered salinities during melting / K.G. Ryan, P. Ralph, A. McMinn // *Polar Biol.* 2004. V. 27. P. 679-686.
8. Peloquin J.A. The role of phytoplankton size on photochemical recovery during the Southern Ocean Experiment / J.A. Peloquin, W.O. Smith Jr. // *J. Phycol.* 2006. V. 42. P. 1016-1027.
9. Kirst C.O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989. V. 40. P. 21-53.
10. Rijstenbil J.W. Impact of a temporal salinity decrease on growth and nitrogen metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum* in continuous cultures / J.W. Rijstenbil, L.R. Mur, J.A. Wijnholds, J.J. Sinke // *Mar. Biol.* 1989. V. 101. P. 121-129.
11. Rijstenbil J.W. Implications of salinity fluctuations for growth and nitrogen metabolism of the marine diatom *Ditylum brightwellii* in comparison with *Skeletonema costatum* / J.W. Rijstenbil, J.A. Wijnholds, J.J. Sinke // *Mar. Biol.* 1989. V. 101. P. 131-141.
12. Cifuentes A.S. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient / A.S. Cifuentes, M.A. Gonza'lez, I. Inostroza, A. Aguilera // *J. Phycol.* 2001. V. 37. P. 334-344.
13. Радченко И.Г. Рост и фотосинтетическая активность диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* при снижении солености / И.Г. Радченко, Л.В. Ильяш // *Известия АН. Серия Биол.* 2006. № 3. С. 306-313.
14. Hasle G.R. Marine diatoms / G.R. Hasle, E.E. Syvertsen // *Identifying Marine Phytoplankton* / Ed. C.R. Tomas. San Diego, California, Academic Press. 1997. P. 5-385.
15. Генкал С.И. К морфологии, экологии и распространению *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta) / С.И. Генкал, М.С. Куликовский // *Поволжский экол. журн.* 2009. № 3. С. 183 - 189.

16. Guillard R.R.L. Studies on marine diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. / R.R.L. Guillard, J.H. Ryther // Can. J. Microbiol. 1962. V. 8. P. 229-239.
17. Franklin D.J. Effect of dead phytoplankton cells on the apparent efficiency of photosystem II // D.J. Franklin, C.J. Choi, C. Hughes, G. Malin, J. Berges // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2009. V. 382. P. 35-40.
18. Reeves S. The effect of prolonged darkness on the growth, recovery and survival of Antarctic sea ice diatoms / S. Reeves, A. McMinn, A. Martin // Polar Biol. 2011. V. 34. P.1019-1032.
19. <http://folk.uio.no/ohammer/past/>
20. Veldhuis M.J.W. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth / M.J.W. Veldhuis, G.W. Kraay, K.R. Timmermans // Eur. J. Phycol. 2001. V. 36. P.167-177.
21. Rijstenbil J. W. UV- and salinity-induced oxidative effects in the marine diatom *Cylindrotheca closterium* during simulated emersion // Mar. Biol. 2005. V. 147. P. 1063-1073.
22. Foyer C.H. Photooxidative stress in plants / C.H. Foyer, M. Lelandais, K.J. Kunert // Physiol. Plant. 1994. V. 92. P. 696-717.
23. Liu W. Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation / W. Liu, Y. Ming, P. Li, Z. Huang // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 54. P. 43-48.
24. Lu I. Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata* / I. Lu, M. Sung, T. Lee // Mar. Biol. 2006. V. 150. P. 1-15.
25. Guidi L. Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: A tool to study abiotic stress in plants / L.Guidi, E. Degl'Innocenti // Abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations / Eds. A. Shanker, B.Venkateswarlu. Rijeka, Croatia, InTech. 2011. P. 3-20.
26. Hare P.D. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants / P.D. Hare, W.A. Cress // Plant Growth Regul. 1997. V. 21. P. 79-102.
27. Rynearson T.A. Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae) / T.A. Rynearson, E.V. Armbrust // J. Phycol. 2004. V. 40. P. 34-43.
28. Iglesias-Rodriguez M.D. Intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae): the use of microsatellite analysis in marine phytoplankton population studies / M.D. Iglesias-Rodriguez, O.M. Schofield, J. Batley, L.K. Medlin, P.K. Hayes // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 526-536.
29. Lopez-Rodas V. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations / V. Lopez-Rodas, M. Agrelo, E. Carrillo, L. Ferrero, A. Larrauri, L. Martin-Otero, E. Costas // Eur. J. Phycol. 2001. V. 36. P. 179-190.
30. Elowitz M. Stochastic gene expression in a single cell / M. Elowitz, A. Levine, E. Siggia, P. Swain // Science. 2002. V. 297. P. 1183-1186.



V.A. Kurochkina, T.A. Belevich, S.I. Pogosyan, L.V. Il'yash

## FLUORESCENCE VARIABILITY OF INDIVIDUAL CELLS OF THE ALGAE *Conticribra weissflogii* UNDER OSMOTIC STRESS CONDITIONS

Relative fluorescence of individual cells of the diatoms *Conticribra weissflogii* acclimated to 17,5‰ salinity was estimated after transfer to media with 8,8‰ (hyposmotic conditions), 35‰ (hyperosmotic conditions) and 17,5‰ (control) salinity. It was shown that at first 2-4 h in hypo- and hyperosmotic conditions part of nonviable cells increased, part of cell with maximal relative fluorescence lowered and fluorescence variability of cells was the highest. After 24 hours part of nonviable cells decreased by contrast percent of cell with maximal fluorescence grew and cell variability declined.

**Key words:** fluorescence, population heterogeneity, osmotic stress, *Conticribra weissflogii*