

S.E. Dyatlov, V.V. Nikulin, A.G. Petrosyan, O.V. Koshelev, Yu.I. Bogatova, O.M. Rusnak, V.D. Urnya, N.F. Podpletnaya, L.Yu. Sekundyak

Odesa Branch A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas NAS of Ukraine

RESULTS OF ECOLOGOTOXICOLOGY MONITORING OF SHIP MOTION DANUBE-BLACK SEA IN 2008

The work includes the monitoring results of Danube coast in 2008. The increased oil content was observed in the water which comes from the Starostambulskoe Girlo. The tendency of reducing the amount of heavy metals in water compared with 2007 is determined. Using TRIX index it is found that the Danube remains the main source of eutrophication of Black Sea.

Key words: Ship motion, Danube, monitoring, heavy metals, oil, trophic status

УДК 582.26/.27:591.148:574.52

В.Є. ЄРОХІН, А.П. ГОРДІЄНКО

Інститут біології південих морів НАН України
пр-т Нахімова, 2, Севастополь 99011

ВИКОРИСТАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ОЦІНКИ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНОГО І ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

Викладено методичні підходи й результати дослідження динаміки спектральних характеристик люмінесценції мікроводоростей, на підставі яких зроблено висновок про функціональну активність і фізіолого-біохімічний стан мікроводоростей на різних фазах розвитку в умовах автотрофного й міксотрофного живлення.

Ключові слова: мікроводорості, функціональна активність, люмінесценція, спектральний аналіз

При промисловому вирощуванні одноклітинних водоростей, а також при моніторингу морського фітопланктону, виникає необхідність одержання оперативної інформації про фізіологічний стан досліджуваних об'єктів.

Стандартні методи лабораторного контролю показників фізіолого-біохімічного стану культур мікроводоростей, як правило, трудомісткі і вимагають дорогого обладнання і значних витрат. Виходячи з цього, на сучасному етапі розвитку промислового культивування мікроводоростей, ці методи не можуть повною мірою задовільнити вимоги біотехнологів.

У літературі недостатньо даних щодо використання методів люмінесцентного спектрального аналізу для оптимізації режиму культивування мікроводоростей.

Метою дослідження був подальший розвиток цього підходу для одержання ряду характеристик спектрів люмінесценції, які можна використати для діагностики фізіолого-біохімічного стану й функціональної активності мікроводоростей, а також оперативно застосовувати в технологічному процесі культивування водоростей і у дослідженнях по оптимізації складу поживних середовищ.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведені на альгологічно чистих культурах мікроводоростей *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta), *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta), *Prorocentrum cordatum* (Dinophyta) та *Nitzschia closterium* (Bacillariophyta).

Під час проведення роботи використаний спектрофлуорофотометр «RF 5000» («Shimadzu», Японія). Для проведення аналізу в кювету спектрофлуорофотометра вносили 3 мл культури й реєстрували спектр люмінесценції *in vivo*. Повний опис техніки експериментів був зроблений нами раніше [2, 3, 8].

Збудження здійснювали випромінюванням ксенонової лампи високого тиску (150 W) при довжині хвилі 365 нм (щілина 5–10 нм). Вимірювання проводили в спеціальній „нефлуоресціюючій” кюветі товщиною 10 мм, розташованій для реєстрації спектрів люмінесценції під кутом 90°.

У ряді випадків використовували інші довжини хвиль збудження (436 нм, 515, 546 нм) або здійснювали синхронне сканування зразків з випередженим збудженням на 20–30 нм. При вимірюваннях дотримувались жорсткої стандартизації умов відбору проб і проведення вимірювання. При визначенні кількості проб виходили із завдань того або іншого експерименту.

На основі даних спектрів люмінесценції розраховували параметри, що віддзеркалюють співвідношення фотоавтотрофного й гетеротрофного компонентів системи енергозабезпечення фотосинтезуючих клітин, і робили висновок про функціональну активність і фізіолого-біохімічний стан водоростей у культурі. Для опрацювання отриманих даних використовували стандартні статистичні методи.

Результати досліджень і їх обговорення

Під час проведення досліджень було використано розроблений й апробований нами метод оптимізації складу поживних середовищ культур ціанобактерії *A. platensis* на середовищах з різним вмістом азоту [2]. Метод зводиться до того, що в період циклу вирощування регулярно ресерують спектри люмінесценції культур одноклітинних водоростей, визначають співвідношення інтенсивностей смуг випромінювання пігментів і на основі аналізу спектрів люмінесценції коректують технологічний режим вирощування.

В основу цього методу були покладені наявні розробки. Раніше, одним із авторів була показана [5] можливість оцінки функціональної активності макрофітів при фенольній інтоксикації із застосуванням методу мікроспектрофлуориметрії. При цьому виходили з того, що відновлені піридиннуклеотиди (НАДН і НАДФН) мають власну люмінесценцію в області 465–480 нм. При переході в окислений стан, здатність до люмінесценції втрачається. Окислені форми флавіномононуклеотиду (ФМН) і флавінаденідинуклеотиду (ФАД) мають люмінесценцію в області 520–530 нм. Нами запропонований безрозмірний коефіцієнт ξ , за допомогою якого можна оцінити зміну енергетичного обміну клітин на його термінальній стадії та здійснювати об'єктивну оцінку адаптації енергогенеруючого апарату макрофітів до впливу фенолів: $\xi = I_{530} - 0,5 I_{465} / I_{465}$.

Трохи інший підхід був використаний для оцінки функціонального стану синьо-зелених водоростей М.І. Кузьменком [7], який запропонував коефіцієнт гетеротрофної (автотрофної) активності: $K_2 = I_{460-530\text{нм}} / I_{680\text{нм}}$. Люмінесцентний мікроспектральний аналіз застосовували також для контролю за станом систем енергетичного обміну клітин рослин з метою біомоніторингу [6]. Як характеристичні параметри, що віддзеркалюють співвідношення фотоавтотрофного й гетеротрофного компонентів системи енергозабезпечення фотосинтезуючих клітин вищих рослин і деяких водоростей, автори використали співвідношення: $\chi = I_{680} / I_{530}$; $\phi = I_{680} / I_{643}$; $\psi = I_{680} / I_{572}$.

З метою оптимізації режиму культивування мікроводоростей *H. pluvialis* нами виконано комплексне дослідження з використанням люмінесцентного спектрального аналізу одночасно зі стандартними фізіолого-біохімічними методами [3, 8]. При розрахунку коефіцієнтів гетеротрофної активності були використані додатково наступні взаємовідношення інтенсивностей люмінесценції: I_{460} / I_{680} ; I_{520} / I_{680} ; I_{460} / I_{520} .

Досліджені спектральні характеристики люмінесценції культур клітин *H. pluvialis* залежно від хімічного складу поживних середовищ. Визначено динаміку коефіцієнтів ступеня гетеротрофності культур на різних стадіях їхнього розвитку при різних умовах живлення.

Заресстровано перехід культур *H. pluvialis* з автотрофного на гетеротрофний режим енергозабезпечення при стимулюванні каротиногенезу високими концентраціями ацетату та хлориду натрію, зміною освітлення й температури.

Зроблено висновок про можливість використання люмінесцентного спектрального аналізу культур *in vivo* для об'єктивної оцінки характеру адаптацій ключових центрів автотрофного й гетеротрофного метаболізму в клітинах *H. pluvialis* до умов живлення, а також для підбору джерел органічного вуглецю для поживних середовищ. Відзначено, що при додаванні в культуральне середовище розчинених органічних речовин (мідійного гідролізату) [1, 4], мікроводорості *P. cordatum* й *N. closterium* активно споживали мідійний гідролізат протягом усього експерименту. Люмінесцентні характеристики цих мікроводоростей дозволили заресструвати використання змішаного типу живлення в *N. closterium* і перехід на гетеротрофне споживання мідійного гідролізату в *P. cordatum*.

Динаміка параметра χ , що характеризує співвідношення внеску фотоавтотрофної й гетеротрофної систем енергозабезпечення клітини, свідчить про зростання активності ферментативних систем окисного фосфорилування, що при заресстрованому зниженні інтенсивності фотосинтезу свідчить про зміну типу живлення або, швидше за все, збільшення частки гетеротрофного енергозабезпечення.

Для культури *N. closterium* спостерігали (порівняно з контролем, на середовищі Гольдберга) поступове зниження інтенсивності фотосинтезу з паралельним посиленням енергогенерації в гетеротрофній системі енергозабезпечення клітини (збільшення χ), що, ймовірно, свідчить про використання змішаного типу метаболізму. Динаміка параметра χ в культурі *P. cordatum* свідчить про те, що в цього виду планктонних водоростей при зміні джерела вуглецю відбувається багатогодинна адаптація до нового джерела живлення.

Висновки

Спектральні характеристики люмінесценції задовільно віддзеркалюють зміни фізіолого-біохімічного стану клітин мікроводоростей при вирощуванні на різних поживних середовищах. Отримані дані узгоджуються з результатами прямих вимірювань динаміки чисельності клітин, вмісту в них сухої речовини, хлорофілу *a*, а також візуальними спостереженнями за морфо-фізіологічним станом клітин у культурах і можуть бути використані для експрес-оцінки функціонального стану мікроводоростей.

1. Патент №53327А Україна, МКИ 7 А23L1/333. Спосіб одержання гідролізату з молосків / В.С. Єрохін, М.О. Голуб; заявник і патентовласник Севастополь, Ін-т біол. півд. морів НАН України. – № 2002043479; заявл. 25.04.02; опубл. 15.01.03, Бюл. № 1.
2. Патент №16270 Україна, МПК С12N 1/12. Спосіб культивування одноклітинних водоростей / В.С. Єрохін, А.П. Гордієнко, І.С. Мінюк; заявник і патентовласник Севастополь, Ін-т біол. півд. морів НАН України. – №20040403008; заявл. 22.04. 04; опубл. 15.08. 06, Бюл. №8.
3. Єрохін В.Е. Исследование динамики люминесцентных спектральных характеристик *Haematococcus pluvialis* при различных условиях питания / В.Е. Єрохін, Г.С. Мінюк, А.П. Гордієнко [и др.] // Морські біотехнічні системи. – Севастополь, 2005. – Вип. 3. – С. 70–81.
4. Єрохін В.Е. Динамика роста планктонных водорослей в накопительной культуре с добавками растворенных органических веществ / Єрохін В.Е., Голубь Н.А. // Мікроводоросли Чорного моря: проблеми збереження біорізноманітності та біотехнологічного використання. – Севастополь, 2008. – С. 320–342.
5. Карнаухов В.Н. Состояние энергетического аппарата макрофитов в норме и при фенольной интоксикации / Карнаухов В.Н., Єрохін В.Е. // Экология моря. – 1981. – Вип. 6. – С. 61–65.
6. Карнаухов В.Н. Люминесцентный микроспектральный анализ в биомониторинге загрязнения воздушной среды / В.Н. Карнаухов, А.С. Керженцев, А.Е. Лисовский [и др.]. – Пушино: Науч. центр биол. иссл. АН СССР, 1983. – 31 с.
7. Кузьменко М.И. Миксотрофизм синезеленых водорослей и его экологическое значение / М.И. Кузьменко. – К.: Наук. думка. 1981. – 212 с.
8. Мінюк Г.С. Физиолого-биохимические и биофизические характеристики зеленой одноклеточной водоросли *Haematococcus pluvialis* Plotow (Chlamidomonales) – перспективного источника природного астаксантина / Г.С. Мінюк, В.Е. Єрохін, А.П. Гордієнко [и др.] // Мікроводоросли Чорного моря: проблеми збереження біорізноманітності та біотехнологічного використання. – Севастополь, 2008. – С. 353–382.

В.С. Єрохін, А.П. Гордієнко

Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Изложены методические подходы и результаты исследования динамики спектральных характеристик люминесценции микроводорослей, на основании которых делали заключение о функциональной активности и физиолого-биохимическом состоянии микроводорослей на различных фазах развития в условиях автотрофного и миксотрофного питания.

Ключевые слова: микроводоросли, функциональная активность, люминесценция, спектральный анализ

V.E. Erokhin, A.P. Gordienko

Institute of Biology of the Southern Seas of NAS of Ukraine, Sevastopol

USE OF LUMINESCENT SPECTROLOGY FOR ESTIMATION PHYSIOLOGO-BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL STATE OF MICROALGAE

Methodical approaches and microalgae luminescence spectral characteristics dynamics studying were described and conclusion about microalgae functional activity and physiologo-biochemical condition at the different development stages under conditions of autotrophic and myxotrophic nutrition was made on their base.

Key words: microalgae, functional activity, luminescence, spectrology