

І.А. ХАРЧУК

Інститут біології південних морів НАН України
пр. Нахімова, 2, м. Севастополь

ВПЛИВ ДЕЯКИХ ФАКТОРІВ НА РЕАКТИВАЦІЮ *SPIRULINA PLATENSIS* NORDST (*ARTHROSPIRA*)

Ключові слова: реактивація, життєвість, ангідробіоз, ціанобактерії
Key words: reactivation, viability, anhydrobiosis, cyanobakterium

І.А. KHARCHUK

SEVERAL FACTORS REACTIONS ON *SPIRULINA PLATENSIS* NORDST (*ARTHROSPIRA*) REACTIVATION

Institute of the Biology of Southern Seas
2 Nakhimov av., Sevastopol

Several factors reactions on *Spirulina platensis* reactivation. Influence of various mediums used on the first stage of *Spirulina platensis* Nordst reactivation and relation of cyanobakterium dehydration temperature with the further cell viability recreation were studied. It was shown that viable cell portion of cultures dehydrated under the temperature of 20°C and 70°C differs a lot on the various reactivation stages. Depending on the used medium various indicators of cell viability were marked on the first reactivation stage.

Збереження мікроорганізмів – актуальна науково-практична проблема. Досягнення біотехнології, що продемонстрували велике прикладне значення мікроорганізмів, підсилили інтерес до створення спеціальних центрів для збирання, збереження і розподілу біоматеріалів [6].

Одним зі способів збереження культур є ангідробіоз. Ангідробіоз – це здатність організмів до глибокої тривалої дегідратації без порушення життєвих структур, зі збереженням здатності до кількаразового відновлення активної життєдіяльності в разі оводнення [7]. Створення повної картини ангідробіозу неможливе без широкого охоплення дослідженнями різноманітних об'єктів. Початок ангідробіозу легше всього досліджувати на прокаріотичній клітині та найпростіших еукаріотах. Клітини ціанобактерій є перспективним об'єктом для таких досліджень.

Реактивація мікроорганізмів після ангідробіозу є найменш вивченим процесом відновлення життєдіяльності популяції. Дуже важливим є початок реактивації, оскільки від нього залежить не тільки швидкість, але і якість відновлення життєдіяльності клітин. Важливі також умови, за яких ці клітини були зневоднені.

Мета цієї роботи полягала у вивченні впливу обраного середовища для реактивації і температури висушування ціанобактерій *Spirulina platensis* Nordst на повернення мікроорганізмів зі стану ангідробіозу до активної життєдіяльності.

Матеріали та методика

Експерименти проводили від 8 квітня до 10 травня 2003 р. Об'єктом дослідження була культура ціанобактерій *Spirulina platensis* Nordst (рід *Cyanophyta*), культивована, а потім переведена до стану ангідробіозу в травні 2003 р. у лабораторії ІнБПМ НАНУ.

Одночасно проводили чотири паралелі експериментів. Використовували культури спіруліни: 1-а культура, висушена за температури 20°C; 2-а культура, висушена за температури 70°C; 3-я культура, висушена за температури 20°C не відмита від середовища, на якій вона була попередньо культивована (середовище Заррука) [8].

Зразки, кожен масою 20 мг, зволожували 2 мл: перша паралель – стерильною водопровідною водою, друга паралель – розчином 0,25М NaCl, третя паралель – середовищем Заррука, розведеним стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:2, четверта паралель – цільним середовищем Заррука. Через 20 хв. розчини видалляли і до зразків доливали 20 мл середовища Заррука, розведеного у співвідношенні 1:2. До четвертої паралелі додавали цільне середовище Заррука. Температура розчинів становила 30°C. Колби виставляли на люміностаг із безперервним освітленням. Інтенсивність освітлення вимірювали люксметром Ю – 116. Інтенсивність світла коливалася у межах 2,6 – 2,8 klux.

Визначення живих і мертвих клітин здійснювали методом фарбування метиленовою синню (1:10), з одночасним кількісним обліком реактивованих і визначенням частки життєздатних клітин.

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження реактивації ціанобактерій з ангідробіозу показали, що вихід із цього стану пов'язаний зі зволоженням і появою вільної води в клітинах понад зв'язану воду, що містилася в організмі, після чого клітини здобувають первісного нативного вигляду. Відбувається відновлення ушкоджених елементів клітини, оскільки під час зневоднення у клітинах спостерігаються істотні зміни обміну речовин та енергії, а також частково ушкоджуються клітинні структури [4]. Перехід до життєдіяльності настає з досягненням визначеного ступеня набрякання протоплазм клітин. Очевидно, при цьому вже відновлюється зв'язок усіх ділянок клітини одна з одною та органел, що і є передумовою життєдіяльності клітини загалом. При цьому відновлюються процеси асиміляція на додаток до дисиміляції, що відбулася в початковий момент зволоження, відбувається їх взаємодія, що спричинює, очевидно, спочатку відновлення слабкої та обмеженої, а потім, за ще більшого вмісту води, повної життєдіяльності [5, 7].

У перший день після реактивації спостерігали розбіжності кількості життєздатних клітин залежно від температури висушування і використаних середовищ. У культури спіруліни, висушеної за температури 20°C, після зволоження стерильною водопровідною водою частка реактивованих клітин становила ~ 90%, 0,25М розчином хлориду натрію – ~ 80%, розчином Заррука (1:2) – ~ 90%, розчином цільного середовища Заррука – ~ 80%; у культури спіруліни, висушеної за температури 70°C, після зволоження названими розчинами

частка реактивованих клітин становила 0%, під час мікроскопічного дослідження відзначено багато лізованих клітин; у культури спіруліни, висушеної за температури 20°C, не відмітої від середовища – 0% життєздатних клітин, під час мікроскопічного дослідження були помітні внутрішньоклітинні включення – кристалики солей.

На другий день у культурі спіруліни, висушеної за температури 20°C, частки реактивованих клітин становили ~ 90%, 80%, 90%, 80%, відповідно; у культурі спіруліни, висушеної за температури 70°C, після зволоження стерильною водопровідною водою – ~ 10%, 0,25М розчином хлориду натрію – ~ 10%, розчином Заррука (1:2) – ~ 10%, розчином цільного середовища Заррука – ~ 10%, під час мікроскопічного дослідження зразків відзначено багато деформованих ниток, це може бути частково пояснене тим, що під час дегідратації клітин відбувається деяке зменшення їх розмірів [2], а в ході поглинання води висохлим організмом можливо й “місцеве” відновлення життєдіяльності в окремих частинах, що набухають, в яких уміст води швидше досягнув достатньої величини, тоді як організм загалом ще не одержав необхідної кількості води. Недостатнє підвищення вмісту води після зволоження висохлих організмів є несприятливим для їх переходу до життєдіяльності, затримує їх у проміжних станах, перебування в яких призводить до загибелі [3]. У культурі спіруліни, висушеної за температури 20°C, не відмітої від середовища, спостерігали ~ 1% живих клітин, а під час мікроскопування ниток були помітні міжклітинні перегородки й внутрішньоклітинні включення (кристалики солей).

На третій день у культурі спіруліни, температура сушіння якої становила 20°C, усі паралелі були без змін. У культурі спіруліни, висушеної за температури 70°C, частки живих клітин становили ~ 60%, 70%, 85%, 75%, відповідно, мікроскопічно спостерігали багато розірваних ниток, але з кінцевими клітинами, що сформувалися. У культурі спіруліни, висушеної за температури 20°C, не відмітої від середовища було виявлено ~ по 3% реактивованих клітин.

На четвертий день експерименту в культурі спіруліни, переведеної у стан ангідробіозу за температури 20°C, відзначали зниження показників життєздатних клітин, вони становили ~ 30%, 40%, 50%, 45%, відповідно, під час мікроскопування відзначено багато ниток, що розпадалися. У культурі спіруліни, переведеної у стан ангідробіозу за температури 70°C, констатували збільшення частки живих клітин до ~ 62%, 73%, 88%, 81%, відповідно, мікроскопічно спостерігали появу молодих ниток. У культурі спіруліни, переведеної у стан ангідробіозу за температури 20°C, не відмітої від середовища, показники за всіма паралелями залишалися без зміни. Очевидно, це відбувається за рахунок того, що кристали солі ушкоджують оболонку й клітинні структури, і, як наслідок, призводять до загибелі мікроорганізмів на початкових стадіях зневоднювання.

На стадії зневоднення у клітині до деякої міри мають місце явища, що властиві процесу старіння: зменшення вмісту вологи, ущільнення клітинної речовини, підвищення концентрації продуктів життєдіяльності та ін. [1]. Процес старіння, як відомо, тривалий, у той час як штучне зневоднення може бути здійснене протягом дуже короткого часу. Імовірно, цим і може бути по-

яснена відносно висока частка життєздатних клітин у культурах спіруліни, зневоднених за температури 70°C. У культур, висушених за температури 20°C, у перші дні також відзначали велику частку життєздатних клітин, з подальшим зниження їх кількості. Про втрату життєздатності в деяких випадках судять за відсутністю в досліджуваних клітин здатності до розмноження, росту чи руху, за втратою здатності до здійснення окремих ферментативних процесів, за зміною рН клітини, за інтенсивністю поглинання клітинами ультрафіолетових променів (мертві клітини поглинають їх інтенсивніше) [1]. На сьогодні точно не встановлені причини смерті клітин ні під час старіння, ні за штучного зневоднювання. Однак слід зазначити, що за нижчих температур сушіння процес зневоднення відбувається довше, і клітини можуть утратити життєздатність у результаті ферментативних процесів, що відбуваються у них. Автоліз може відбутися у тих випадках, коли клітини довго залишаються на межі активного й неактивного станів.

Важливими є перші етапи реактивації, тому паралельно аналізували значення типу середовища для первинного зволоження сухих зразків. Під час зволоження зразків стерильною водопровідною водою відбувалося вивільнення фікоціаніну з досліджуваних зразків, з інших зразків фікоціанін не виділявся. Таке явище пояснюється законами осмосу. Під час зволоження зразків названими вище розчинами найвища частка життєздатних клітин відзначена, як у перші години, так і надалі, в разі первинного зволоження середовищем Заррука (1:2). Це зумовлено тим, що концентрація солей у розведеному середовищі оптимальніша для зневоднених клітин і не спричинює біогенного шоку.

Неможливість переходу до життєдіяльності може бути зумовлена й зануренням висушлих організмів у воду з великим умістом солей, у нашому експерименті – цільного середовища Заррука. Високий осмотичний тиск розчину перешкоджає повному набряканню клітин.

Висновки

1. Реактивація ціанобактерій *Spirulina platensis* відбувається швидше в разі зволоження зневоднених клітин розчином середовища Заррука, розведеним у співвідношенні 1:2.
2. Під час зволоження сухих зразків цільним середовищем Заррука створюється високий осмотичний тиск розчину, що перешкоджає повному набряканню зневоднених клітин.
3. У культурах, що були висушені за температури 70°C, реактивація відбувалася повільніше, відзначалося подовження лаг-фази, за якою наступала стадія експонентного росту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бекер М.Е. Обезвоживание микробной биомассы и экстрацеллюлярных метаболитов. – Рига: Зинатне, 1967. – С. 70-76.
2. Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. – Рига: Зинатне, 1987. – С. 84-91.
3. Голдовский А.М. Анабиоз. – Л.: Наука, 1981. – С. 28-29.

4. **Голдовский А.М.** Основы учения о состоянии организмов. – Л.: Наука, 1977. – С. 10-70.
5. **Кузьмина Р.И.** Исследование анабиоза у водорослей // Альгология. – 1992. – 3, № 4. – С. 15-21.
6. **Сидякина Т.М.** Консервация микроорганизмов в коллекциях культур // Серия “Консервация генетических ресурсов”. – Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1991. – С. 81-139.
7. **Ушатинская Р.С.** Скрытая жизнь и анабиоз. – М.: Наука, 1990. – С. 119-134.
8. **Faucher O., Coupal B., Leduy A.** Utilization of seawater – urea as a culture medium for *Spirulina maxima* // National Research Council of Canada. – 1979. – P. 752-759.