

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М. В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

На правах рукописи

БОЙЧУК Татьяна Викторовна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЛИЯНИЯ СЕРЕБРА НА МИКРОВОДОРОСЛИ (НА
ПРИМЕРЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *Scenedesmus quadricauda*)**

03.00.18 – Гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА – 2007

Работа выполнена на кафедре гидробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник **А. Г. Дмитриева**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор **В. А. Абакумов**

Доктор биологических наук, профессор **И. И. Васильева-Кралина**

Ведущая организация:

Астраханский государственный технический университет

Защита состоится 19 апреля 2007 года в 15 часов 30 мин на заседании специализированного ученого совета Д 053.05.71 в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет, ауд. 389

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

Автореферат разослан 12 марта 2007 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Н. В. Карташева

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время проблема чистой воды относится к числу наиболее актуальных в связи с увеличивающейся антропогенной нагрузкой на биоту. В общем объеме токсического загрязнения водной среды основную часть составляет загрязнение тяжелыми металлами. Это сказывается на состоянии гидробионтов, которые являются продуцентами органического вещества, участвуют в процессах самоочищения водоемов и транспортировке веществ по пищевой цепи.

Возможные последствия загрязнения окружающей среды оцениваются, прежде всего, в токсикологическом эксперименте при поступлении загрязнителей в малых концентрациях, появление которых способно привести к существенным отдаленным последствиям для экосистемы. Применение лабораторных культур водорослей в экологических исследованиях дает возможность исследовать действие токсиканта на функциональные и морфологические показатели растительной клетки, оценить действие токсиканта на модельную популяцию микроводорослей, а также изучить некоторые экологические особенности той или иной группы водорослей (Paasche, 1978).

В настоящее время большее внимание уделяется роли ионов серебра в жизнедеятельности водных организмов. Это связано с широким применением ионов серебра в хозяйственной деятельности человека, в том числе и пищевой промышленности. Однако действие серебра на растительные водные организмы изучено недостаточно. Особую актуальность приобрело исследование механизмов и закономерностей биоцидного действия серебра в различных формах в связи с его использованием в качестве средства управления развитием бактерий и водорослей в водной среде (Кульский, 1982; Бойчук, Прохоцкая, 2004).

В связи с вышесказанным, **целью данной работы** было исследование структурно-функциональных характеристик модельных популяций зеленой хлорококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. при действии ионов серебра с учетом свойств культуры, некоторых условий испытаний и режима воздействия токсиканта.

В задачи работы входило:

1. Исследовать динамику роста модельных популяций *S. quadricauda*, культивируемых на средах Успенского № 1 и Прата при действии сульфата и нитрата серебра.
2. Определить эффект серебра на изменение численности, размеры и фотосинтетическую активность клеток водоросли.
3. Оценить жизненное состояние культуры *S. quadricauda* при токсическом воздействии солей серебра.

4. Дать оценку степени гетерогенности лабораторных популяций *S. quadricauda* в норме и при действии серебра методом микрокультур.

5. Выявить возможность адаптации культур водорослей к токсиканту по их устойчивости к возрастающей токсической нагрузке и оценить их способность к восстановлению после ее прекращения.

6. Применить новый интегральный способ оценки эффекта токсиканта по изменению временной суммарной численности клеток за периоды наблюдений в норме и при интоксикации.

Научная новизна. Впервые установлено, что токсическое действие ионов серебра на микроводоросли при концентрациях 0,0001 – 0,01 мг Ag/л зависело от физиологического состояния культуры и сезона года, а при более высокой концентрации (0,1 мг Ag/л) проявлялся альгостатический эффект, обусловленный торможением деления, повышением смертности и замедлением деградации погибших клеток. Впервые применен метод временной суммарной численности клеток (ПСЧ), который позволяет сопоставлять результаты опытов и дать интегральную оценку действия токсиканта. Впервые установлены различия структурного состава популяций *S. quadricauda*, включенных в эксперимент на разных фазах развития. В культуре, взятой в опыт на логарифмической фазе роста, преобладала фракция размножившихся клеток. Культура, взятая в опыт на стационарной фазе развития, была представлена преимущественно покоящимися клетками. Показано, что в процессе длительной (101-сут.) интоксикации происходит отбор резистентных клеток, которые после прекращения токсической нагрузки способны восстановить популяцию водорослей.

Практическая значимость. Результаты могут быть использованы для оценки токсического действия серебра и выбора условий его применения для предотвращения цветения воды, в фармацевтической промышленности и других производствах, а также при установлении допустимых лимитов загрязнения водной среды ионами металла. Новый метод расчета ПСЧ может быть использован для оценки токсичности практически любого загрязняющего вещества на организмы.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на: пятой международной конференции «Водные экосистемы и организмы - 5» (Москва, 2003); 2-ом съезде токсикологов России (Москва, 2003); международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов - 2004» (Москва, 2004); шестой международной конференции «Водные экосистемы и организмы - 6» (Москва, 2004); международной научно – практической конференции МГУ – СУНИ «Человечество и

окружающая среда» (Москва, 2004); международной конференции «Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных системах», посвященной памяти проф. М. В. Гусева (Москва, 2006).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы. Список литературы включает 161 источник, в том числе и на иностранном языке. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 7 таблицами, приложение содержит 25 таблиц.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования была лабораторная альгологически чистая культура пресноводной хлорококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. Для экспериментов использовали нормально развивающуюся культуру водорослей, частично синхронизированную чередованием “дня” и “ночи”, с исходной численностью 100 – 200 тыс. кл/мл. Культивирование водорослей проводили на средах Успенского № 1 и Прата (Успенская, 1966) в люминостате с интенсивностью света до 5 тыс. люкс, при 12 – часовом чередовании света и темноты и температурой 20 – 24 °С (РД 118-02-90, 1991).

В качестве токсиканта использовали ион серебра Ag^+ в форме раствора солей Ag_2SO_4 или $AgNO_3$. Влияние сульфата и нитрата серебра в диапазоне концентраций от 0,0001 до 0,1 мг/л изучалось на однократно- и дважды синхронизированных культурах, находившихся на фазах логарифмического и стационарного роста. Испытания проводили в трех повторностях для каждой концентрации и контроля.

Численность клеток определяли с помощью светового микроскопа в камере Горяева с одновременным учетом линейных размеров клеток с помощью окуляр-микрометра. Методом люминесцентной микроскопии оценивали соотношение живых и мертвых клеток (в % от общей численности) (Дмитриева, 1988). Эффективность фотосинтеза клеток измеряли по максимальной флуоресценции с помощью портативного импульсного флуориметра (Маторин и др., 1992). Оценку гетерогенности популяции проводили методом микрокультур с расчетом удельных рождаемости и смертности клеток (Филенко и др., 2004). Для обобщенной характеристики культур был применен показатель повременной суммарной численности клеток (ПСЧ), который отражал величину общей численности клеток за весь период наблюдения за культурой. Статистическую обработку полученных результатов производили

в соответствии с "Методическим руководством по биотестированию воды" (РД 118-02-90, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Динамика численности клеток *Scenedesmus quadricauda* в норме (без интоксикации).

1.1. Численность клеток культуры при выращивании на разных средах.

Первоначально был проанализирован рост водоросли без добавления токсиканта на средах Успенского № 1 и Прата (рис. 1). Увеличение общей численности клеток водорослей в разные сезоны в обеих средах носило сходный характер согласно логистической кривой. В целом, водоросли достаточно хорошо росли на обеих средах. Быстрее всего увеличение численности клеток наблюдалось в летний период на обеих средах, а весной - на среде Прата.

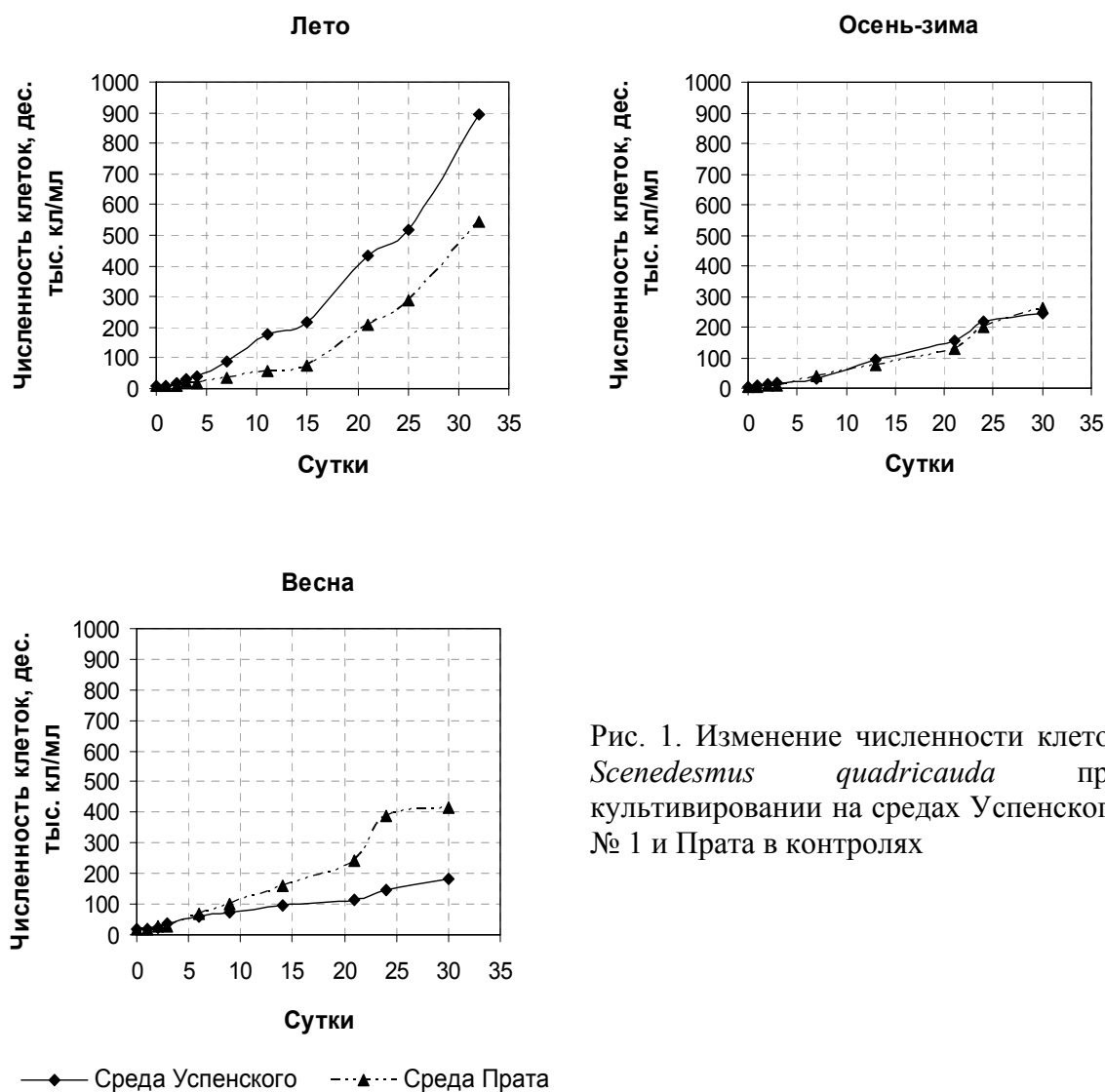
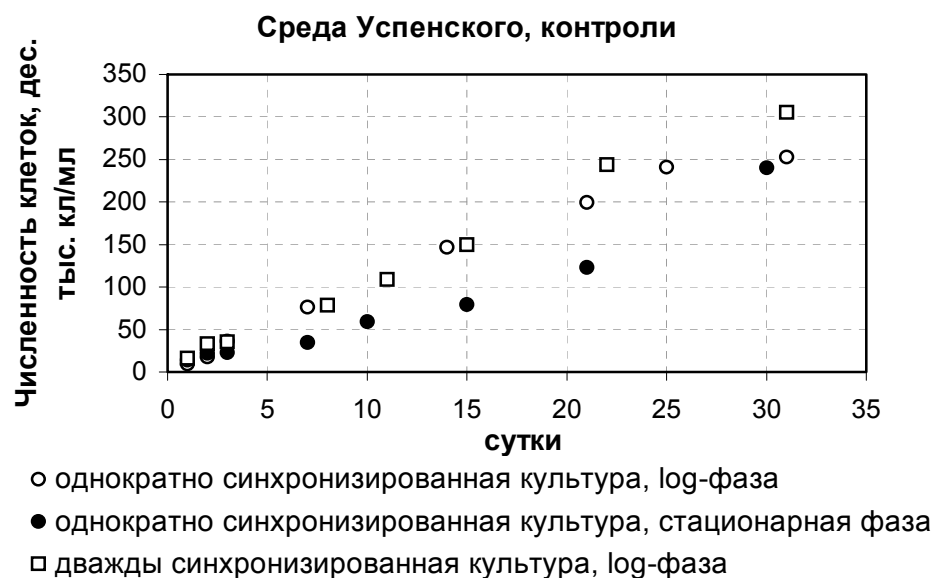


Рис. 1. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* при культивировании на средах Успенского № 1 и Прата в контролях

1.2. Рост культур водорослей *S. quadricauda* при пересевах на разных фазах развития и при разных режимах синхронизации. Анализ динамики численности клеток водорослей контрольных культур при разных режимах интоксикации и взятых в эксперимент на разных фазах развития показал, что первые трое суток численность клеток нарастала практически одинаково, после 7-ых суток наблюдались различия (рис. 2). Если однократно и дважды синхронизированные культуры нарастали в целом сходно, то однократно синхронизированная культура, взятая на стационарной фазе развития, значительно отставала, однако к концу эксперимента ее численность была близка к значениям двух других контрольных культур. Этот факт можно объяснить тем, что изначально культура, взятая на стационарной фазе развития, содержала только 66 % живых клеток. В дальнейшем, по мере развития культуры водорослей, численность живых клеток достигла 96 %, за счет чего и произошло общее увеличение численности клеток к концу эксперимента. Таким образом, видно, что развитие культуры в норме в целом не зависело от степени синхронизации культуры, а влияние оказывала фаза роста, на которой культура была взята в эксперимент.

Различие численности клеток в разных контрольных культурах на протяжении роста не превышало 25 %. В популяции водорослей присутствовали как крупные, так и мелкие клетки в составе 2- и 4-клеточных ценобиев. 8-клеточные ценобии в контрольных культурах были встречены только в летний и осенне-зимний периоды. Эффективность фотосинтеза на среде Прата была несколько ниже, чем на среде Успенского № 1 (рис. 9).

Рис. 2. Динамика численности культур микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*, взятых в эксперимент на разных фазах роста и при разных режимах синхронизации



2. Динамика численности клеток *Scenedesmus quadricauda* при интоксикации серебром. Были проведены исследования эффекта на рост культур *S. quadricauda* сульфата и нитрата серебра в концентрациях от 0,0001 до 0,1 мг Ag/л.

2.1. Численность клеток культуры *S. quadricauda*, выращенной на разных средах и в разные сезоны года, под действием сульфата серебра.

В зимний период были проведены эксперименты на средах Успенского № 1 и Прата при действии сульфата серебра в концентрациях 0,0001; 0,001; 0,01 и 0,1 мг Ag/л (рис. 3). При концентрации серебра 0,0001 мг/л на обеих средах численность клеток изменялась в пределах контроля (разница не превышала 26 %). Только на 2-е сутки эксперимента численность клеток на среде Успенского № 1 снизилась на 50 %, а на среде Прата, наоборот, увеличилась на 33 %. На среде Прата в присутствии 0,001 мг Ag/л на 1-2 сутки происходило заметное увеличение численности по сравнению с контролем (почти в 2 раза), а с третьих суток и до конца эксперимента численность клеток была практически на уровне контроля, кроме 21 и 24 суток. При 0,01 мг Ag/л на среде Прата на 1-2 сутки численность клеток оставалась на уровне контроля, а на третьи - на 70 % достоверно превышала его. Затем, до конца эксперимента, разница между опытом и контролем не превышала 35%, как и при концентрации 0,001 мг Ag/л. Концентрация 0,1 мг Ag/л была высокотоксичной на протяжении всего эксперимента, и на 30 сутки численность клеток была близка к исходной (8.7×10^4 кл/мл на 1-ые сутки и 6.0×10^4 кл/мл – на 30-е).

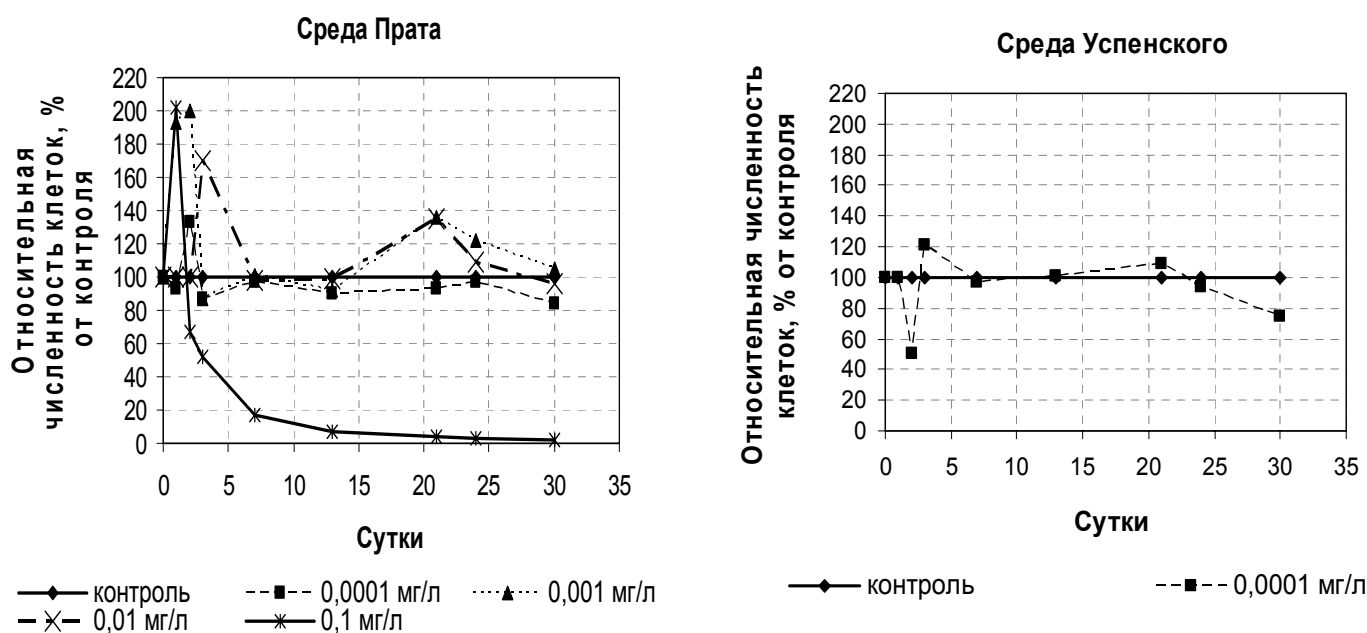


Рис. 3. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* при действии сульфата серебра при культивировании на разных средах в осенне-зимний период (концентрации приведены в мг Ag/л)

Время удвоения численности клеток в диапазоне концентраций 0,0001 – 0,01 мг Ag/л было близким к контролю (в среднем 1 деление за 5 суток). Только при концентрации 0,1 мг Ag/л

на среде Прата время 1-го клеточного деления увеличилось по сравнению с контролем почти в 2 раза и составило почти 9 суток.

Следующая серия опытов была проведена в марте месяце. В присутствии 0,0001 мг Ag/л на среде Успенского № 1 после первых суток эксперимента происходило снижение численности, сменившееся ее восстановлением до контрольного уровня (рис. 4). И только на 30-е сутки наблюдалось торможение роста популяции, как и в опыте в зимний период. На среде Прата при данной концентрации сульфата серебра на протяжении всего опыта наблюдалось постепенное увеличение численности клеток, превысившее на 30-е сутки уровень контроля на 27 %. Численность клеток при 0,001 мг Ag/л, как на среде Успенского № 1, так и на среде Прата, варьировала со сменой фаз «угнетение – стимуляция» в течение 20 суток эксперимента, после которых наблюдалась стимуляция, в большей степени проявившаяся на среде Успенского №1.

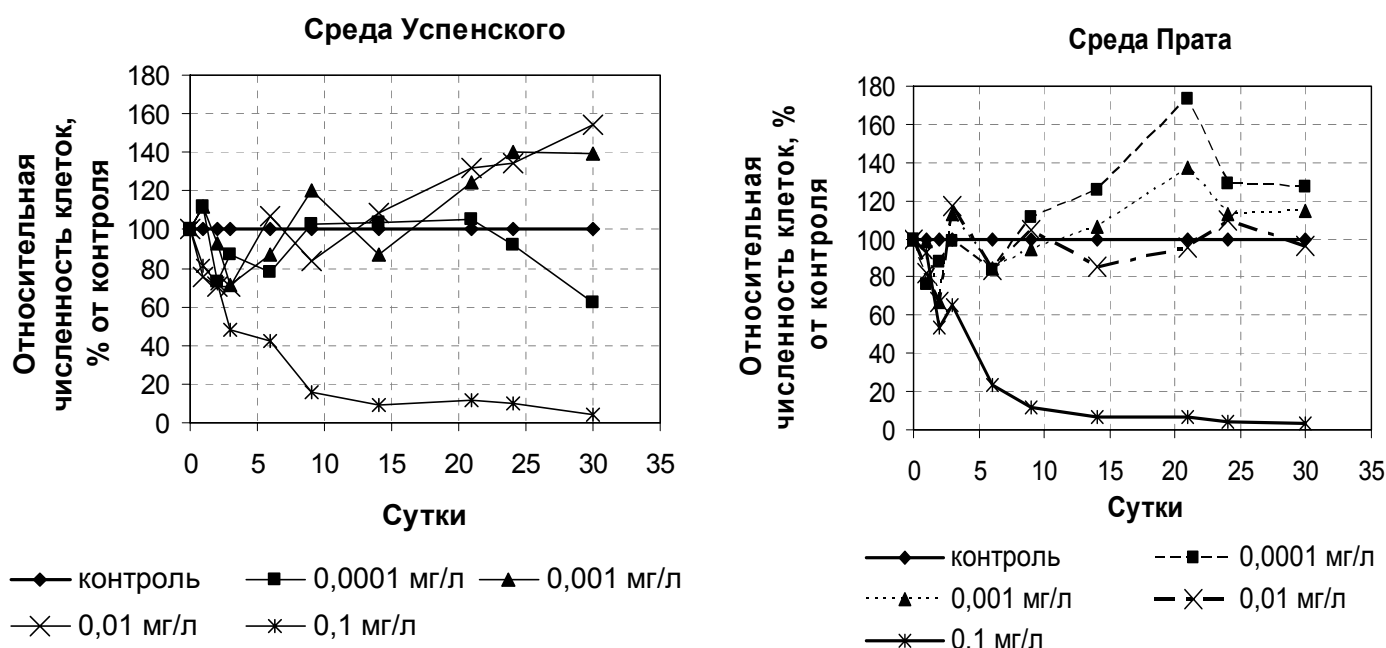


Рис. 4. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* под действием сульфата серебра при выращивании на разных средах в марте (концентрации приведены в мг Ag/л)

Если при концентрации серебра 0,01 мг/л на среде Прата численность клеток изменялась в пределах контроля на протяжении всего опыта, то на среде Успенского № 1 после 10-х суток происходило постепенное увеличение численности клеток, и на 30-е сутки стимуляция составила 54 % от контроля. Токсический эффект серебра зарегистрирован при 0,1 мг Ag/л уже в первые сутки эксперимента. При этом численность клеток популяции после 10-ых суток находилась практически на одинаково низком уровне и к 30-м суткам она составляла на обеих средах 3,3 – 4 % от контроля. При этом наблюдалось торможение клеточного

деления: на среде Прата - в 1,5 раза, на среде Успенского № 1 – почти в 2 раза по сравнению с контролем.

В летний период на среде Успенского № 1 при концентрациях 0,01 и 0,1 мг Ag/л выявлен ингибирующий эффект (рис. 5). При 0,001 мг Ag/л обнаружен угнетающий эффект, сопоставимый с действием серебра в концентрации 0,01 мг/л на 10-е и 32-е сутки эксперимента, несмотря на то, что в 1-е сутки опыта имела место значительная стимуляция. На среде Прата токсический эффект также получен при 0,1 мг Ag/л. При 0,001 и 0,01 мг Ag/л численность клеток изменялась сходным образом - стимуляция в течение первых 5 суток и на 25-е сутки. Однако на 32-е сутки при 0,001 мг Ag/л проявился стимулирующий эффект, а при 0,01 мг Ag/л наблюдалось снижение численности на 20 % от контроля.

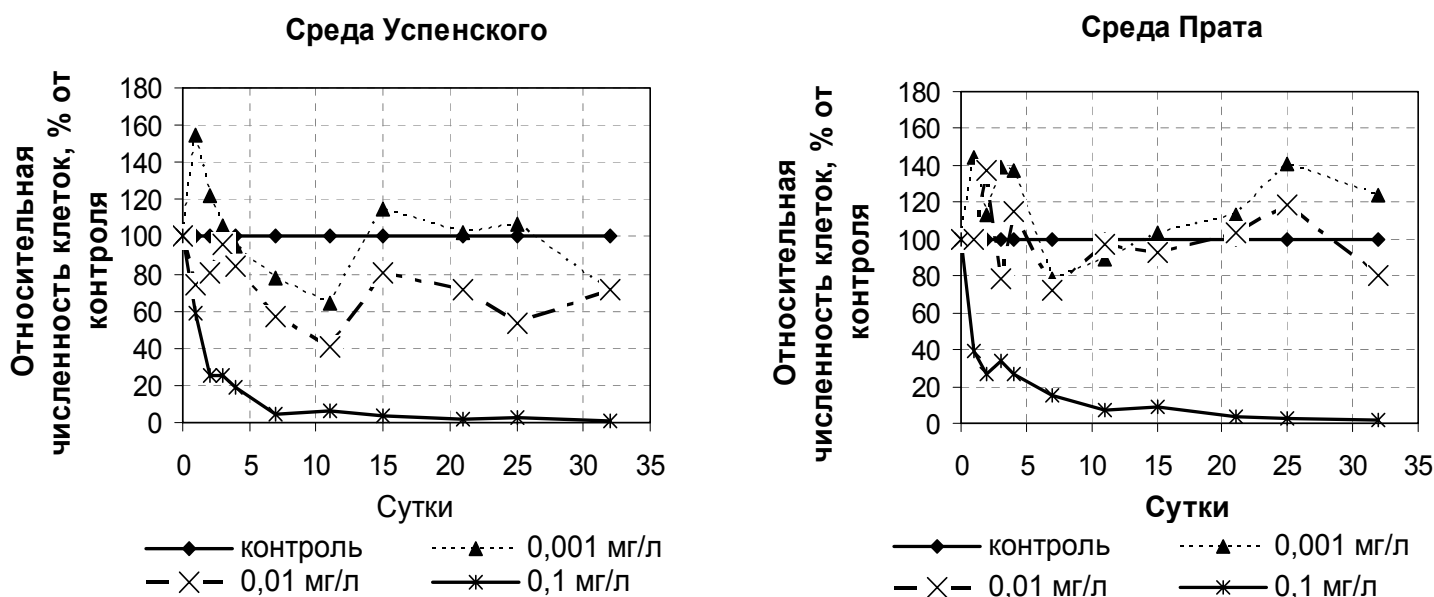


Рис. 5. Изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda* под действием сульфата серебра при культивировании на разных средах в летний период (концентрации приведены в мг Ag/л)

Различные реакции, выявленные у *S. quadricauda*, выращенной на разных средах, при концентрациях сульфата серебра 0,001 и 0,01 мг Ag/л скорее всего связаны с разным минеральным составом сред. При самой высокой из исследованных концентраций 0,1 мг Ag/л, как и в предыдущих экспериментах, наблюдалось торможение клеточного деления: на среде Успенского № 1 одно клеточное деление происходило за 8,3 суток, на среде Прата – за 6,6 суток. Причем как в ранне-весеннем, так и в летнем опытах темп клеточного деления у водоросли, росшей на среде Успенского № 1, был ниже.

Сравнительный анализ роста водорослей в разные сезоны года на двух средах в присутствии одних и тех же концентраций сульфата серебра показал, что при 0,1 мг Ag/л токсическое действие серебра было сходным и не зависело от физиологической активности

водорослей в разные сезоны года и состава среды выращивания. В присутствии более низких концентраций серебра в среде выращивания наблюдавшиеся отличия в реакции на токсикант определяются, скорее всего, различной физиологической активностью водорослей, выращенных на разных средах и в разные сезоны года.

2.2. Динамика численности клеток культуры *S. quadricauda* разной степени синхронизации, взятой в эксперимент на разных фазах роста, под действием нитрата серебра. Летний эксперимент был проведен с однократно синхронизированной культурой *S. quadricauda*, взятой в эксперимент на логарифмической фазе роста и состоящей преимущественно (более 90 %) из живых клеток. Токсический эффект при концентрациях 0,01 и 0,1 мг Ag/л прослеживался с первых суток эксперимента и более четко проявился при 0,1 мг Ag/л: после 5-ых суток опыта численность клеток была минимальной и сохранялась на уровне, близком к исходной численности клеток (рис. 6). При меньших концентрациях нитрата серебра (0,0001 и 0,001 мг Ag/л) численность клеток изменялась в пределах контроля. Однако к концу эксперимента она достоверно снизилась, особенно при концентрации 0,001 мг Ag/л (на 50 %). Расчет среднего времени удвоения показал, что с увеличением концентрации замедлялся темп клеточного деления, за исключением концентрации 0,01 мг Ag/л, при которой клетки делились со скоростью, близкой к контрольной. Самым медленным клеточное деление было при 0,1 мг Ag/л (одно деление за 9,5 суток), как и в предыдущих экспериментах с сульфатом серебра.

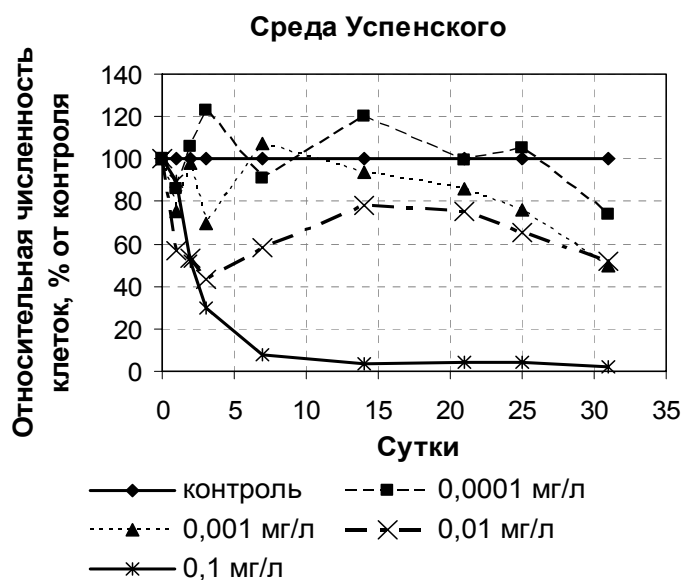


Рис. 6. Изменение численности клеток однократно синхронизированной культуры *Scenedesmus quadricauda*, взятой в эксперимент на логарифмической фазе развития, под действием нитрата серебра (концентрации приведены в мг Ag/л)

Однократно синхронизированная культура водоросли *S. quadricauda*, взятая в эксперимент на стационарной фазе развития в **весенний период**, содержала только 66 % живых клеток. При действии нитрата серебра в концентрациях 0,0001 мг Ag/л и 0,001 мг Ag/л наблюдался эффект стимуляции (рис. 7), а при концентрации 0,01 мг Ag/л ингибирующий

эффект проявился после 7-х суток и к концу эксперимента численность была близкой к исходной. Если среднее время одного клеточного деления в контроле и при концентрациях 0,0001 и 0,001 мг Ag/л было близким и составляло 5,2 – 5,5 суток, то при 0,01 мг Ag/л оно было в 2 раза больше (10,6 суток), т. е. происходила задержка темпа клеточного деления.

Летом изменение численности клеток в дважды синхронизированной культуре *S. quadricauda*, состоявшей исключительно из молодых делящихся клеток, взятой в эксперимент на логарифмической фазе роста, в присутствии концентраций нитрата серебра 0,0001 и 0,001 мг Ag/л шло в том же режиме, что и у однократно синхронизированной культуры, взятой в эксперимент на стационарной фазе роста (рис. 8). При концентрации серебра 0,01 мг/л также наблюдался ингибирующий эффект, наиболее активно проявившийся в период 8 – 11 суток. Однако, в отличие от однократно синхронизированной культуры, взятой на стационарной фазе развития, после 11-х суток опыта происходило нарастание численности клеток, но она была достоверно ниже контроля (на 35 - 40 %). Расчет среднего времени удвоения численности показал, что при концентрациях 0,0001 и 0,01 мг Ag/л

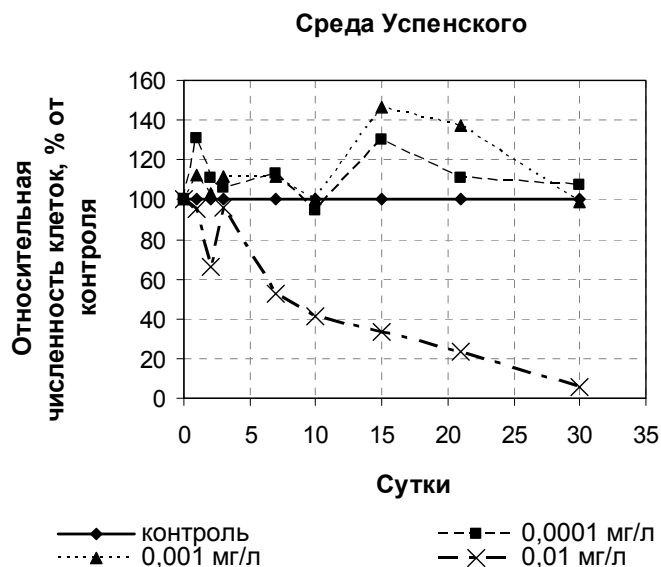


Рис. 7. Изменение численности клеток однократно синхронизированной культуры *Scenedesmus quadricauda*, взятой в эксперимент на стационарной фазе развития, под действием нитрата серебра (концентрации приведены в мг Ag/л)

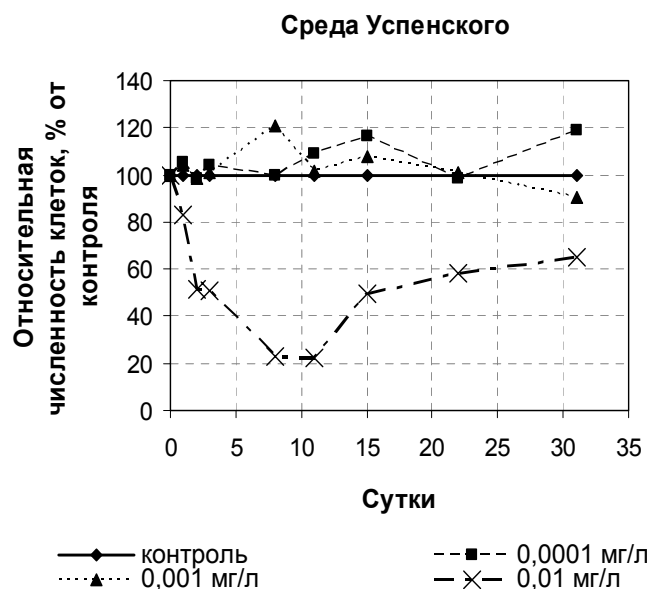


Рис. 8. Изменение численности клеток дважды синхронизированной культуры *Scenedesmus quadricauda*, взятой в эксперимент на логарифмической фазе развития, под действием нитрата серебра (концентрации приведены в мг Ag/л)

каждое клеточное деление в среднем происходило за 5,6 и 5,8 суток, соответственно. Самым медленным темп деления клеток был при концентрации серебра 0,001 мг/л (одно деление за 6,1 суток), в контроле же одно деление происходило за 5,8 суток.

Итак, эксперименты, проведенные с культурами *S. quadricauda* в разные сезоны года и разной их физиологической активностью показали, что при концентрации 0,1 мг Ag/л как нитрата, так и сульфата серебра, наблюдался токсический эффект, который в большей степени зависел от концентрации самого катиона металла и в меньшей степени – от исходного физиологического состояния водоросли. Одновременно выявлено и альгостатическое действие ионов серебра, выразившееся в поддержании численности клеток на низком уровне, близком к исходной численности клеток, в течение всего периода наблюдений. Культура *S. quadricauda*, использованная в эксперименте на стационарной фазе роста, оказалась более чувствительной, чем культура на логарифмической фазе роста, токсический эффект нитрата серебра проявился в концентрации, меньшей на порядок – 0,01 мг Ag/л.

3. Изменчивость структурно-физиологических показателей культуры водорослей в присутствии ионов серебра.

3.1. Оценка жизнеспособности микроводорослей методом люминесцентной микроскопии. Как показал люминесцентный анализ, однократно синхронизированная культура водоросли *S. quadricauda* в логарифмической фазе роста содержала до 90 – 95 % живых клеток. В присутствии в среде нитрата или сульфата серебра соотношение живых и мертвых клеток изменялось в зависимости от концентрации вещества. Наиболее значимые изменения обнаружены при концентрации 0,1 мг Ag/л, где к концу наблюдений живых клеток оставалось 0,5 – 5 %. При меньших концентрациях (0,0001 – 0,01 мг Ag/л), как правило, в культурах живых клеток было 85 – 95 %. В эксперименте с культурой, взятой для испытаний на стационарной фазе роста, изначально содержалось 66 % живых клеток. Однако в присутствии нитрата серебра количество живых клеток постепенно увеличилось до 95 % при концентрациях 0,0001 и 0,001 мг Ag/л, а при концентрации 0,01 мг Ag/л, наоборот, снизилось до 4,8 %, как и при концентрации 0,1 мг Ag/л. Полученный результат указывает на более высокую чувствительность культуры *S. quadricauda* на стационарной фазе развития к серебру. После длительной (101-суточной) повторной экспозиции (0,01 → 0,1 → 0,1 мг Ag/л), когда живыми оставались единичные клетки, после пересева в чистую среду наблюдалось постепенное восстановление численности с преобладанием в культуре живых клеток (до 95,5%).

3.2. Фотосинтетическая активность хлорофилла при интоксикации.

Фотосинтетическая активность клеток *S. quadricauda* определялась по I_{\max} при выращивании культур на средах Успенского № 1 и Прата в присутствии различных концентраций сульфата серебра (рис. 9). Если при концентрациях 0,001 и 0,01 мг Ag/л на среде Прата уровень I_{\max} изменялся в пределах контроля, то на среде Успенского № 1 в целом был ниже контроля в течение всего эксперимента, за исключением небольшой стимуляции на 31-е сутки при концентрации 0,001 мг Ag/л. При этом уровень I_{\max} был пропорционален численности клеток. Практически полное ингибирование фотосинтетической активности клеток наблюдали при концентрации 0,1 мг Ag/л после 15-х суток, а снижение ее – уже на 3-и сутки опыта.

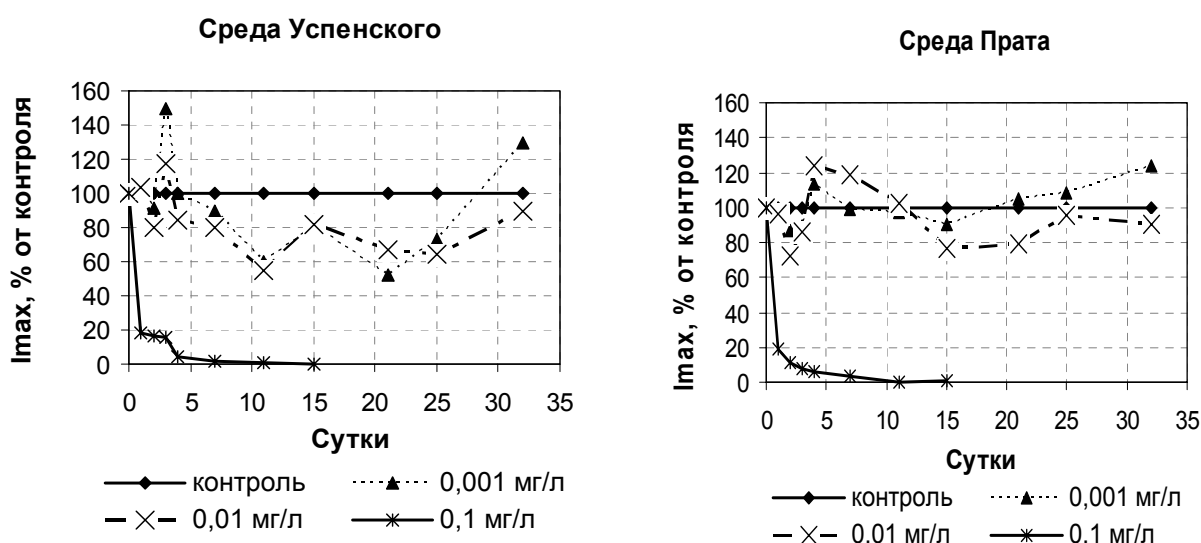


Рис. 9. Интенсивность флуоресценции клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии сульфата серебра (концентрации приведены в мг Ag/л)

3.3. Размерная структура популяции *S. quadricauda* в норме и в присутствии разных солей серебра. Популяции контрольных культур водорослей, росших на средах Успенского № 1 и Прата, были представлены в основном 4-клеточными ценобиями и в меньшей степени - 2-клеточными. В летнем эксперименте на среде Успенского преобладали 2-клеточные ценобии, а 8-клеточные ценобии были обнаружены лишь в осенне-зимних экспериментах на обеих средах. Средние линейные размеры клеток в контроле варьировали. Средняя ширина изменялась в пределах от 3,9 до 4,5 мкм, а средняя длина – от 9,4 до 10,6 мкм. Наиболее крупными клетки были в осенне-зимний и летний сезоны (средний объем клеток составил 140,1 и 148,6 мкм³ соответственно), а самыми мелкими – в ранне-весенний период (средний объем – 117,9 мкм³). Наиболее мелкими клетками была представлена

дважды синхронизированная культура *S. quadricauda*. В присутствии солей серебра размерность клеток варьировала, что приводило как к увеличению, так и к уменьшению среднего объема клеток. В большинстве экспериментов при действии сульфата серебра средний объем клеток или был близок к таковому в контрольной культуре, или увеличивался. А в присутствии нитрата серебра средний объем клеток снижался, особенно при концентрациях 0,1 и 0,01 мг Ag/л. Длина клеток изменялась в более широком диапазоне (от 8 до 10,6 мкм), а ширина – в более узком (3,6 – 4,5 мкм). Такие вариации изменения размерности клеток, скорее всего, можно объяснить разной физиологической активностью клеток в тот или иной период наблюдений.

4. Изменение структуры популяций водоросли *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром.

С помощью метода микрокультур (Филенко и др., 2004; Марушкина, 2005) была произведена оценка гетерогенности популяций *S. quadricauda* в присутствии нитрата серебра. Ранее было показано, что соотношение численности делящихся, покоящихся и отмерших клеток в микрокультуре соответствует соотношению численностей в макрокультурах (поскольку коэффициент корреляции удельного прироста клеток в макро- и микрокультурах составил 0,96).

В однократно синхронизированной культуре, взятой в эксперимент на стационарной фазе роста, в контроле и при 0,0001 мг Ag/л преобладала фракция покоящихся клеток, составлявшая 60–65 %, кроме 14 - 17 суток при концентрации 0,0001 мг Ag/л, где число размножающихся клеток возросло до 50 %. При этом удельная рождаемость клеток была в 2 раза выше, чем в контроле, и составляла 0,3 кл/сут (рис. 10). При концентрации 0,001 мг Ag/л на 21 – 24 сутки преобладала фракция размножающихся клеток (до 83 %), а при 0,01 мг Ag/л популяция была представлена преимущественно покоящимися клетками (60 – 75 %). Однако при 0,0001 мг Ag/л удельная смертность была выше, чем в контроле, в 2 раза, при 0,01 мг Ag/л – более чем в 4 раза, а при концентрации 0,001 мг Ag/л удельная смертность была почти в 10 раз выше, чем в контроле. Различный фракционный состав популяций можно объяснить тем, что при разных концентрациях механизм действия ионов серебра был неодинаков.

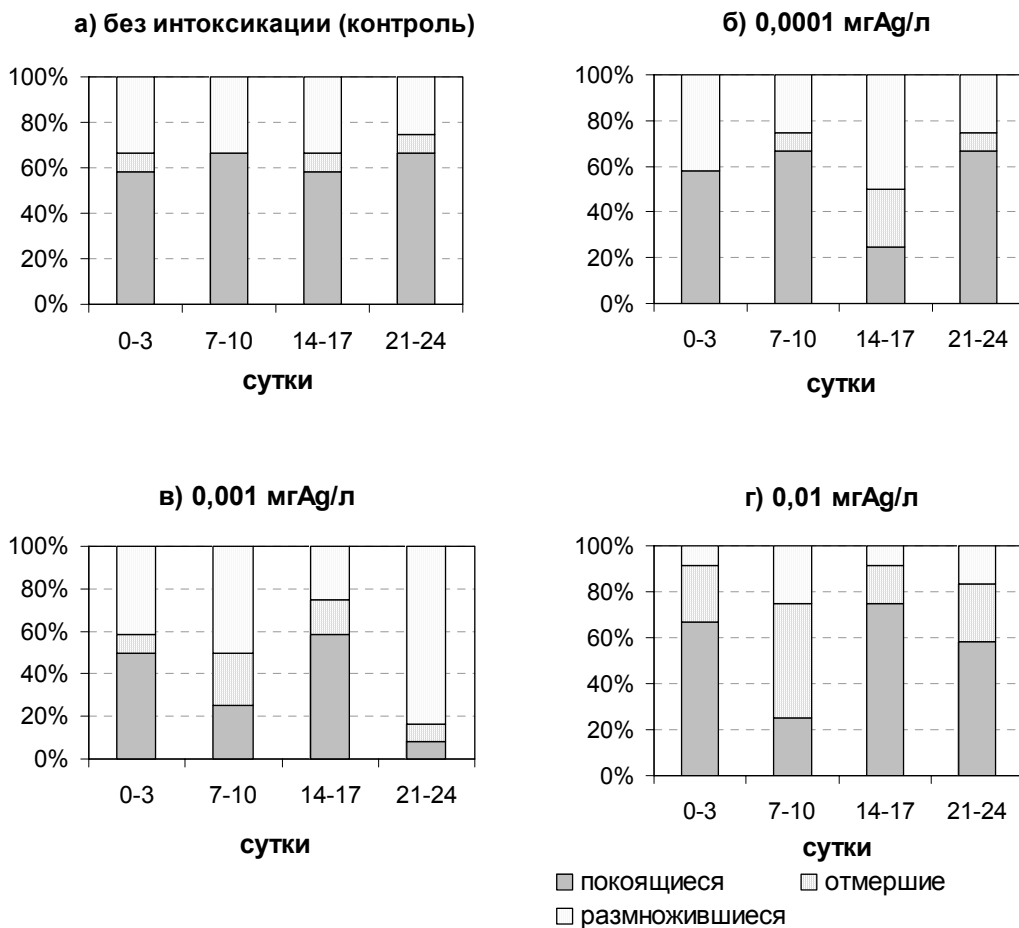


Рис. 10. Фракционный состав микрокультур *Scenedesmus quadricauda*, находящихся на стационарной фазе развития, при действии нитрата серебра

Фракционный состав дважды синхронизированной культуры, взятой в опыт на логарифмической фазе роста, был иным. В контроле и при концентрациях 0,0001 и 0,01 мг Ag/л преобладала фракция размножающихся клеток, особенно в период 21 – 31 суток (рис. 11). При концентрации 0,001 мг Ag/л фракция размножающихся клеток преобладала с 14 по 24 сутки, однако к концу опыта популяция состояла практически из покоящихся клеток (до 96%), т. е. произошло торможение деления клеток и их переход в покоящееся состояние. Удельная рождаемость в контроле и при концентрациях нитрата серебра 0,0001 и 0,01 мг Ag/л на последние сутки наблюдения (28 - 31) была практически одинаковой на фоне повышенной удельной смертности в присутствии серебра. При концентрации 0,001 мг Ag/л удельная рождаемость была ниже, чем в контроле, более чем в 2 раза, а удельная смертность - выше в 1,5 раза. Полученные данные показали, что фракционный состав популяций зависел от степени исходной синхронизации культур микроводорослей. Дважды синхронизированная культура состояла только из молодых размножающихся клеток и ее реакция на интоксикацию была отличной от однократно синхронизированной культуры.

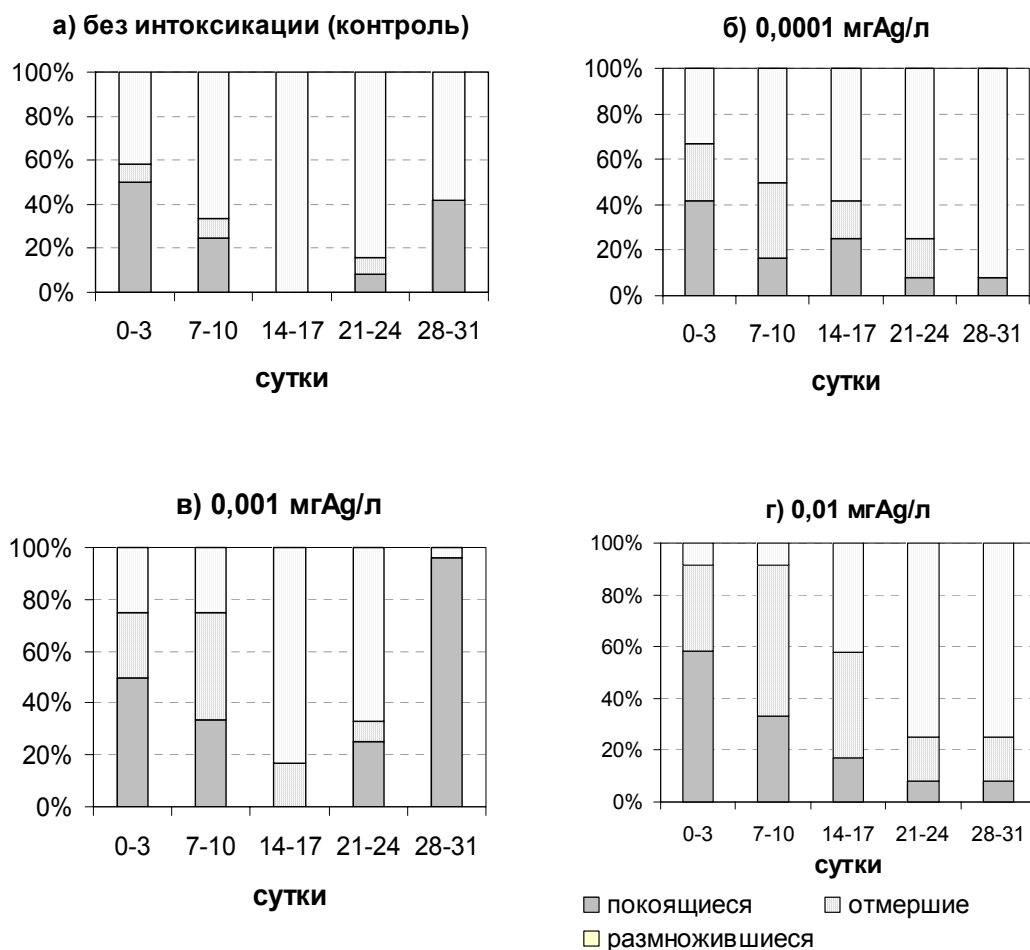


Рис. 11. Фракционный состав дважды синхронизированных микрокультур *Scenedesmus quadricauda* при действии нитрата серебра

5. Адаптация клеток *Scenedesmus quadricauda* к токсиканту.

Для выявления возможности адаптации популяции микроводорослей к серебру в условиях увеличивающейся токсической нагрузки были проведены эксперименты по следующей схеме:

№ этапа опыта	I	II	III	IV
Условия этапа	0,01 мг Ag/л 31 сут	→ 0,1 мг Ag/л 36 сут	→ 0,1 мг Ag/л 34 сут	→ Чистая среда 28 сут

Сначала водоросли месяц выращивались при концентрации нитрата серебра 0,01 мг Ag/л (I этап), затем, после отмывания дистиллированной водой и доведения численности до исходной, их переместили в среду с концентрацией 0,1 мг Ag/л. Через 36 суток (II этап) клетки снова отмывались и заново перемещались в такую же концентрацию (III этап). После месяца повторной экспозиции при концентрации 0,1 мгAg/л водоросли были отфильтрованы, отмыты и пересеяны в чистую среду без токсиканта (IV этап) для оценки возможности

восстановления культуры. После трех этапов интоксикации в популяции оставались живыми 5 % клеток. Восстановление численности клеток после интоксикации протекало медленно. В контроле численность увеличилась в 26 раз к концу эксперимента, после тройной интоксикации же – в 3 раза. При этом восстановленная культура была представлена на 95,5 % живыми клетками, удельная рождаемость увеличилась почти в 2 раза по сравнению с контролем. Структурный состав популяции *S. quadricauda* после пересева в чистую среду оказался близок составу популяции после первоначальной интоксикации при концентрации 0,01 мг Ag/л (рис.12).

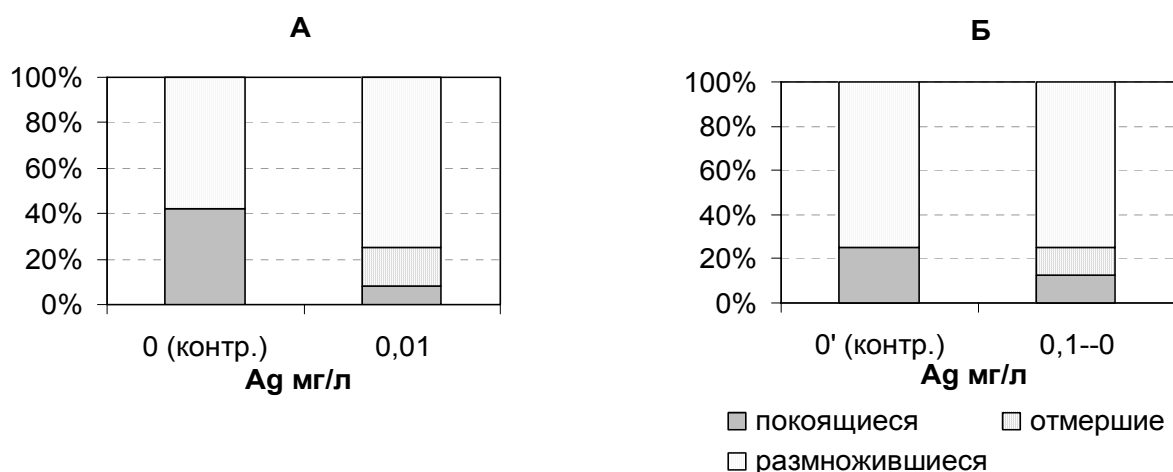


Рис. 12. Фракционный состав культуры водоросли *Scenedesmus quadricauda* при действии нитрата серебра на разных этапах экспозиции:

А – на 28 – 31е сутки в концентрации 0,01 мг Ag/л (I этап);

Б – на 26 – 28е сутки после перемещения из концентрации 0,1 мг Ag/л в чистую среду (IV этап)

В обоих вариантах к концу срока наблюдений популяции были представлены преимущественно размножающимися клетками. Вполне вероятно, что восстановленная после длительной интоксикации популяция клеток водоросли содержала то количество серебра, которое было накоплено в период его начального воздействия в концентрации 0,01 мг Ag/л. Восстановление численности культуры после снятия токсической нагрузки осуществлялось за счет появившихся в результате отбора устойчивых к серебру клеток. Это свидетельствует о том, что имела место активизация адаптационных механизмов, сформированных уже в период первичной интоксикации.

6. Повременная суммарная численность клеток популяции (ПСЧ) *Scenedesmus quadricauda*.

При проведении экспериментов с культурами водорослей разного физиологического состояния в различные сезоны года возникает необходимость поиска интегрального подхода

для оценки их состояния, особенно при изменяющейся токсической нагрузке. Поэтому для обобщенной характеристики и сопоставления реакций культур водорослей использован метод расчета повременной суммарной численности клеток (ПСЧ), отражающий величину общей численности клеток за весь период наблюдения за культурой.

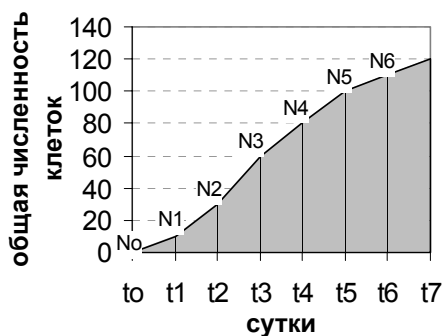
Расчет повременной численности клеток популяции за каждый период наблюдений производили по формуле:

$$\text{ПСЧ} = \sum \frac{1}{2}(N_1 + N_2)\Delta t, \text{ где}$$

N_1 и N_2 – численности клеток на каждую из дат;

Δt – время, прошедшее между последующими и предыдущими датами подсчета.

Пример расчета:



В результате было установлено, что наименьшей ПСЧ была при концентрации 0,1 мг Ag/л (рис. 13), что согласуется с данными по динамике численности клеток и не зависит от формы введения серебра в эксперимент, среды выращивания, сезона года и физиологического состояния культуры микроводорослей, а проявление токсического эффекта определяется влиянием катиона серебра. При меньших концентрациях серебра в среде проявляется влияние физиологического состояния водорослей, а также состава среды и времени выращивания культуры (диапазон распределения был шире). Построение концентрационных зависимостей распределения ПСЧ позволяет получить интегральную оценку действия токсиканта и выявить направленность токсического действия, определяемого влиянием самого токсиканта, а также исходной физиологической активностью водорослей.

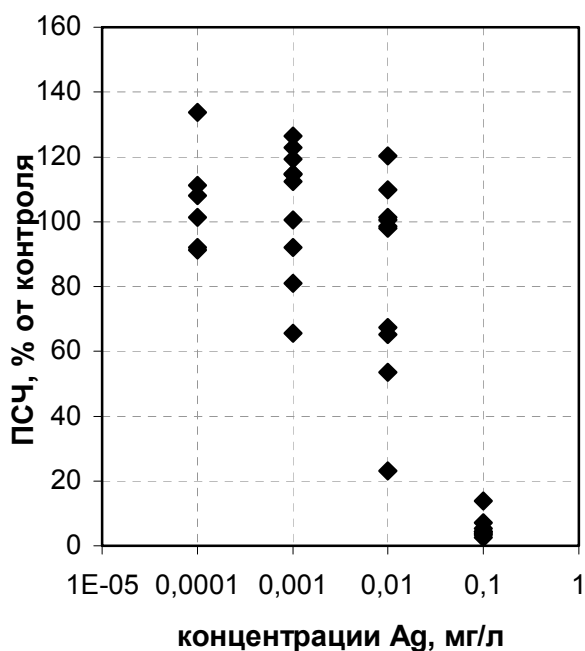


Рис. 13. Повременная суммарная численность клеток популяций (*Scenedesmus quadricauda*) разных экспериментов при различных режимах интоксикации серебром.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Водоросль *Scenedesmus quadricauda* - типичный модельный объект для токсикологических экспериментов как на клеточном, так и на популяционном уровне. При проведении исследований существенное значение имеет унификация методических условий. Результат испытаний может существенно меняться в зависимости от состава среды культивирования, состояния культуры клеток и фазы развития культуры. Проведенные нами эксперименты показали, что лабораторная культура хлорококковой водоросли в норме достаточно хорошо развивалась на средах Успенского №1 и Прата. Отмеченные различия в росте культур на разных средах не носили систематического характера и зависели, главным образом, от исходной физиологической активности культуры в разные сезоны года, а также состава среды выращивания и уровня кратности их синхронизации. Роль фазы развития культуры, на которой она была взята в эксперимент, имела значение для развития новой культуры только в начальный период развития (до 7-ых суток). Анализ структурного состава популяций микроводорослей показал, что чем более синхронизирована исходная культура, тем больше в ее составе размножающихся клеток. Токсический и одновременно альгостатический эффект проявился во всех экспериментах при действии серебра в концентрации 0,1 мг/л независимо ни от физиологической активности водорослей, ни от сезона года, ни от состава среды и аниона серебра. Токсическое действие катиона серебра в данной концентрации подтверждается распределением ПСЧ в узком концентрационном интервале. Длительное сохранение относительно постоянной численности клеток на уровне, близком исходному (альгостатический эффект), обусловлено рядом факторов. Во-первых, замедлением лизиса погибших клеток вследствие связывания токсиканта с компонентами клеток, а также подавлением развития бактерий, участвующих в лизисе клеток. Во-вторых, несмотря на то, что в популяции при данной концентрации серебра оставалось менее 5 % живых клеток и происходило ингибирование процессов фотосинтеза, все же часть клеток делились (1 клетка делилась 1 раз за 7 – 10 суток). Таким образом осуществлялось поддержание численности клеток. Оба эффекта – токсический и альгостатический – были обнаружены и при действии концентрации 0,01 мг Ag/л в эксперименте с культурой, взятой на стационарной фазе роста, что указывает на ее большую чувствительность. В диапазоне более низких концентраций серебра ответные реакции (стимуляция или угнетение) культур *S. quadricauda* зависели от степени ее исходной гетерогенности (уровня синхронизации) и, следовательно, физиологической активности.

Дважды синхронизированная культура микроводоросли, представленная «молодыми» делящимися клетками, оказалась более устойчивой к действию токсиканта. Известно, что устойчивость «молодых» делящихся клеток к стрессу определяется их способностью к образованию защитных анти-окислительных веществ и связыванию вредных веществ (Сиренко, 1970; Шестерин, 1972). При разных уровнях интенсивности токсической нагрузки структурный состав популяций изменялся: в одних случаях преобладала фракция размножившихся клеток, в других – покоящихся, что свидетельствует о разных механизмах воздействия серебра, обусловленных различными темпами накопления и выведения вещества из клетки. Это подтверждено тем, что после снятия 101-суточной токсической нагрузки структурный состав популяции был сходным с составом популяции после первичной интоксикации: в обоих случаях к концу эксперимента преобладала фракция размножившихся клеток. Результаты свидетельствуют о том, что на основе либо материальной, либо функциональной кумуляции серебра в результате отбора сформировался пул устойчивых клеток, обеспечивающих восстановление популяции за счет активизации адаптационных механизмов, имевших место уже в период первичной интоксикации. Сходные результаты были получены и другими исследователями при действии бихромата калия (Чжао Ицзюнь, 1994), пестицидов (Прохоцкая, 2000) и других соединений.

В результате длительной экспозиции водорослей с летальными концентрациями серебра в культурах сохраняются жизнеспособные клетки (до 5 % от исходного числа клеток в культуре). Эта величина близка к приводимым в литературе данным по частоте спонтанных мутаций у одноклеточных водорослей, низших грибов, бактерий и насекомых в естественных условиях (Эрлих, Холм, 1966; Яблоков, Юсуфов, 1976; Тимофеев-Ресовский и др., 1977). Таким образом, полученные данные отражают общую закономерность формирования в популяциях пула устойчивых клеток, которые с помощью приспособительных реакций уравнивают свои взаимоотношения со средой. Степень развития этих взаимоотношений определяет физиологическую норму организма в новых ситуациях. В процессе филогенеза любой организм вырабатывает свои специфические и неспецифические механизмы приспособления, особенно в резко меняющихся условиях окружающей среды. В результате этого пул устойчивых клеток является основной базой для восстановления популяции и последующего сохранения вида.

ВЫВОДЫ

1. Токсический и, в частности, альгостатический эффект действия серебра на микроводоросль *S. quadricauda* выявлен при концентрации 0,1 мг Ag/л и принадлежит

влиянию самого катиона, независимо от среды культивирования, степени синхронизации культуры и сезона года. При этом происходит ингибирование процессов фотосинтеза. Токсическое влияние концентрации 0,01 мг Ag/л обнаружено в культуре, взятой в эксперимент на стационарной фазе развития, что свидетельствует о большей ее чувствительности к действию серебра по сравнению с культурой, использованной на фазе логарифмического роста.

2. Изменение численности клеток *S. quadricauda* практически не зависело от формы внесения серебра. Значимое влияние на эффект серебра в низких концентрациях оказало исходное физиологическое состояние культуры, а именно, фаза роста культуры, на которой она отбиралась в эксперимент, и степень ее синхронизации.

3. Изменчивость линейных размеров клеток *S. quadricauda* в присутствии солей серебра зависела, главным образом, от их физиологической активности в разные сезоны года. Лишь при концентрациях 0,01 и 0,1 мг Ag/л уменьшались линейные размеры и объем клеток, в основном, за счет снижения их длины.

4. Фракционный состав однократно синхронизированной культуры, отсеянной на стационарной фазе роста, был представлен преимущественно покоящимися клетками, а дважды синхронизированной культуры, взятой в эксперимент на логарифмической фазе развития, - размножившимися клетками.

5. Длительная 3-этапная интоксикация при возрастающей концентрации нитрата серебра привела к отбору устойчивых живых клеток, за счет которых после пересева в чистую среду происходило постепенное восстановление численности клеток, благодаря активизации компенсаторно-адаптационных процессов. При этом структурный состав популяции после снятия токсической нагрузки оказался близким ее составу после первоначальной интоксикации с преобладанием фракции размножившихся клеток.

6. Основным механизмом воздействия серебра на клетки *S. quadricauda* является торможение их деления, которое имеет место, как при высоких, так и при низких концентрациях серебра.

7. Расчет поврежденной суммарной численности (ПСЧ) клеток позволяет дать интегральную оценку токсичности серебра. При высокой токсичности концентрационные зависимости распределения ПСЧ располагаются в узком интервале, что указывает на влияние катиона серебра. Широкий размах распределения ПСЧ при низких концентрациях свидетельствует о том, что проявление токсичности серебра в значительной мере зависит от исходной физиологической активности и степени синхронизации культуры водоросли в разные сезоны года.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Прохоцкая В. Ю., Дмитриева А. Г., Бойчук Т. В. (2003). Устойчивость популяции микроводорослей к длительной интоксикации металлами // Тезисы докладов 2 съезда токсикологов России, 10 – 13 ноября, Москва. С. 214 – 215.
2. Бойчук Т. В., Прохоцкая В. Ю. (2004). Токсичность ионов серебра в условиях культивирования *Scenedesmus quadricauda* // Водные системы и организмы – 5. Vol. 6. М. MaxPress. С. 101.
3. Бойчук Т. В. (2004). Влияние ионов серебра на лабораторную популяцию *Scenedesmus quadricauda* // Тезисы докладов XI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2004», 12 – 14 апреля. М.: МГУ. С. 15 – 16.
4. Бойчук Т. В., Прохоцкая В. Ю. (2004). Структура лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda* в присутствии серебра // Водные системы и организмы – 6. Vol. 10. М. MaxPress. С. 32 – 35.
5. Prokhotskaya V. Yu., Dmitrieva A. G., Boichuk T. V., Chernen'kova A. Yu. (2004). Algotatic effect of Silver ions (for microalgae laboratory cultures) // Сборник материалов международной научно-практической конференции МГУ – СУНИ «Человечество и окружающая среда». 26 – 28 октября 2004, Москва, МГУ. С. 153 – 157.
6. Дмитриева А. Г., Филенко О. Ф., Марушкина Е. В., Бойчук Т. В., (2006). Структура лабораторной популяции микроводорослей // Материалы конференции 16 – 19 мая 2006 памяти профессора М. В. Гусева «Физиология микроорганизмов природных и экспериментальных систем». М. С. 74.
7. Дмитриева А. Г., Бойчук Т. В., Филенко О. Ф. (2006). Жизнестойкость популяции *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром // Электронный журнал «Исследовано в России». 245. С. 2326 – 2333.
8. Бойчук Т. В. (2006). Изменение структуры популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром // Естественные и технические науки. № 6 (26). ISSN 1684 – 2626. С. 135 – 140.
9. Дмитриева А. Г., Бойчук Т. В., Филенко О. Ф. (2007). Гетерогенность популяции *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром // Экологические приборы и системы. № 3. С. 42 – 45.

Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н., в.н.с. А. Г. Дмитриевой и профессору О. Ф. Филенко за неоценимую помощь в выполнении и написании диссертационной работы; к.б.н. В. А. Ипатовой за объективную рецензию работы, ценные замечания и советы; коллективу лаборатории водной токсикологии и всем сотрудникам кафедры гидробиологии за поддержку и внимание.