УДК 577.472 : 577.486 : 628.394

И.П. НОВИКОВА[1], Т.В. ПАРШИКОВА[1], В.В. ВЛАСЕНКО[2], И.Б. ЗУБЕНКО[3]

[1] Киевский национальный ун-т им. Тараса Шевченко,
01017 Киев, ул. Владимирская, 60, Украина
[2] Ин-т биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,
02094 Киев, ул. Мурманская, 1, Украина
[3] Ин-т гидробиологии НАН Украины,
04210 Киев, просп. Героев Сталинграда, 12, Украина

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG. В ПРИСУТСТВИИ БИХРОМАТА КАЛИЯ В СРЕДЕ

Исследовано воздействие $K_2Cr_2O_7$ на рост, фотосинтетическую активность и подвижность клеток зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. Установлено, что клетки водоросли чувствительны к воздействию $K_2Cr_2O_7$ даже при низких концентрациях. Определен уровень летальных и сублетальных концентраций $K_2Cr_2O_7$ для ее клеток.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, бихромат калия, численность, концентрация хлорофилла *a*, фотосинтетическая активность, скорость движения, энергозатраты.

Введение

Усиливающееся с каждым годом антропогенное воздействие на окружающую среду требует ее реальной охраны. К числу наиболее опасных химических соединений, попадающих в водную среду, относят тяжелые металлы. При поступлении в водоем они не подвергаются естественной детоксикации, и поэтому длительное время могут циркулировать по цепям экосистемы (Гандзюра, 2002; Дмитриева, 2002). Устойчивые виды растительных организмов в условиях хронического загрязнения воды выдерживают высокие концентрации тяжелых металлов. Однако, в отличие от устойчивых видов, чувствительные организмы погибают. Это снижает разнообразие видов в экосистеме и уменьшает биопродуктивность водоема. Поэтому подбор достаточно устойчивых и сохраняющих жизнеспособность водорослей оказывает существенную помощь в развитии системы мониторинга и оценке степени загрязнения водной среды.

К числу опасных тяжелых металлов с переменной валентностью, загрязняющих водную среду, относится хром. В воде днепровских водохранилищ концентрация его колеблется в довольно широких пределах (Романенко, 2004). Особенно она возрастает в водохранилищах юга Украины, на берегах которых расположены большие металлургические и химические комбинаты. Наиболее высокие показатели содержания хрома зарегистрированы в Запорожском и Каховском водохранилищах. Это, соответственно, составляет 6,7-92,5 и 9,2-112,0 мкг/л в воде и 91,6-147,5; 42,5-112,0 мг/кг сухой массы в донных отложениях

на глубине 0-5 см. В отдельных случаях концентрация шестивалентного хрома в Днепре достигала уровня 18-100 ПДК (Гандзюра, 2002). Известны случаи превышения его концентрации в 10-50 раз в реках Горынь, Тетерев, Унава, Десна, Рось, Самара, Ингулец, Уж (Гандзюра, 2002).

С одной стороны, хром относят к числу обязательных элементов питания животных и растений, поскольку стимулирует ферментные системы, участвует в стабилизации нуклеиновых кислот, с другой – высокие его концентрации токсичны и вызывают раздражающее, кумулятивное, аллергическое, канцерогенное и мутагенное действие (Квасников и др., 1990).

Целью нашей работы было определение устойчивости клеток подвижной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. к присутствию в среде наиболее токсичных соединений шестивалентного хрома на примере $K_2Cr_2O_7$.

Материалы и методы

В качестве тест-объекта мы использовали альгологически чистую культуру *Ch. reinhardtii*, полученную из коллекции Окриджской национальной лаборатории (США). Культивирование водоросли проводили на селективной питательной среде (Сиренко и др., 2005) в колбах Эрленмейера при температуре 20±2 ^oC и освещенности 4500-5000 лк. В опытах использовали культуру на логарифмической фазе роста.

Контроль пигментного комплекса водорослей осуществляли по изменению содержания хлорофилла *a* в клетках нативных водорослей методом дифференциальной флуорометрии с использованием Planctofluorometer FL 300 ЗМ разработки Красноярского ун-та (Гольд, Попельницкий, 1993). Параллельно определяли значение ΔF (разность интенсивности флуоресценции до и после внесения симазина как ингибитора электронного транспорта фотосинтезирующих клеток). Этот показатель оценивал уровень жизнеспособности клеток по величине их потенциальной фотосинтетической активности.

Подсчет количества клеток водорослей проводили с помощью камеры Горяева на микроскопе МБИ-1. Скорость движения клеток водоросли (мкм/с) и их энергозатраты (усл. ед.), долю подвижных клеток определяли с помощью лазерного корреляционно-допплеровского спектрометра (Бегма, Власенко, 1992).

Шестивалентный хром добавляли в среду в виде $K_2Cr_2O_7$ в концентрациях 0,05-135 мг/л. Оценку физиологического состояния клеток проводили через 1, 4 и 7 суток их контакта с хромом. Содержание последнего в воде определяли фотометрическим методом с помощью дифенилкарбазида (Линник и др., 1989). В суспензии водоросли через каждые 24 ч определяли величину pH. Значение последнего регистрировалось в пределах 6,8-7,2.

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов статистического анализа (Лапач и др., 2000). Выводы делали на основании критерия Стьюдента при доверительной вероятности P = 0,95.

Результаты и обсуждение

Данные о динамике содержания $K_2Cr_2O_7$ в клетках *Ch. reinhardtii* представлены на рис. 1. При всех исследуемых концентрациях $K_2Cr_2O_7$ происходило накопление токсиканта в клетках водорослей как на первые, так и на 7-е сут контакта. Это, вероятно, свидетельствует о том, что изменения физиологического состояния клеток микроскопической водоросли происходят под влиянием бихромата калия. Очевидно, что клетки *Ch. reinhardtii* могут его аккумулировать и удалять из среды. Полученные нами данные согласуются с фактами, изложенными в литературе. Установлено, что *Chlamydomonas* sp. способен переносить длительное воздействие бихромата калия в концентрациях 0,20-0,25 мг/л (Barsanti, Gualtieri, 2005) и извлекать до 20 % хрома из среды выращивания. На основании анализа результатов большого количества экспериментальных данных по аккумуляции различных тяжелых металлов был предложен определенный таксономический ряд концентрирования металлов морскими организмами (по степени увеличения): моллюски < бентосные растения (*Embryophyta* < *Phaeophyta* < *Chlorophyta* < *Rhodophyta*) < планктонные организмы (Саенко, 1992). Хотя зеленые микроводоросли не являются наиболее эффективными концентраторами тяжелых металлов в сравнении с другими гидробионтами, по нашему мнению, перспективен поиск среди пресноводных микроскопических водорослей видов, которые могли бы эффективно использоваться в этом направлении.

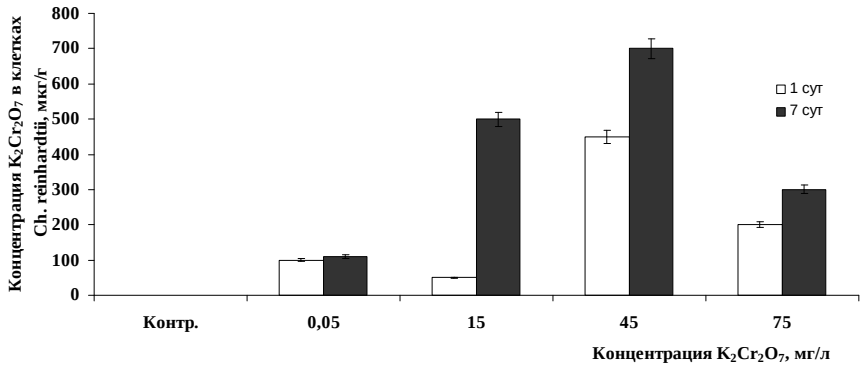

Рис. 1. Аккумуляция $K_2Cr_2O_7$ клетками *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

Как свидетельствуют полученные данные, численность клеток *Ch. reinhardtii* через 1 сут контакта с бихроматом калия последовательно снижалась по сравнению с контролем (рис. 2). Минимальное снижение численности клеток (на 7,8 %) было отмечено для предельно допустимой концентрации бихромата калия – 0,05 мг/л, максимальное – для концентраций более 45 мг/л. Экспериментальные данные, полученные через 4 и 7 сут контакта с бихроматом калия, подтверждают, что токсичность этого соединения усиливается при увели-

чении времени контакта с ним клеток. Через 7 сут контакта с бихроматом калия наблюдалось резкое (на 51 %) снижение численности клеток даже для минимальной исследуемой концентрации по сравнению с контролем. Более высокие экспериментальные концентрации (от 1 до 135 мг/л) последовательно снижали этот показатель на 10 %. Существует точка зрения, что при высокой (сублетальной или летальной) токсичности численность клеток водорослей будет снижаться, а при низкой – повышаться (Дмитриева и др., 2002). Поэтому гетерогенность популяции может быть одним из главных защитных механизмов, позволяющих популяции при экстремальных условиях выживать и восстанавливать свою численность за счет даже минимального фонда наиболее резистентных клеток.

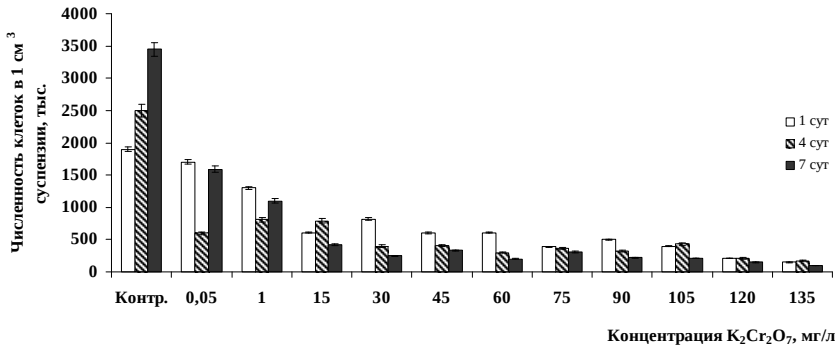

Рис. 2. Изменение численности клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. под действием различных концентраций бихромата калия

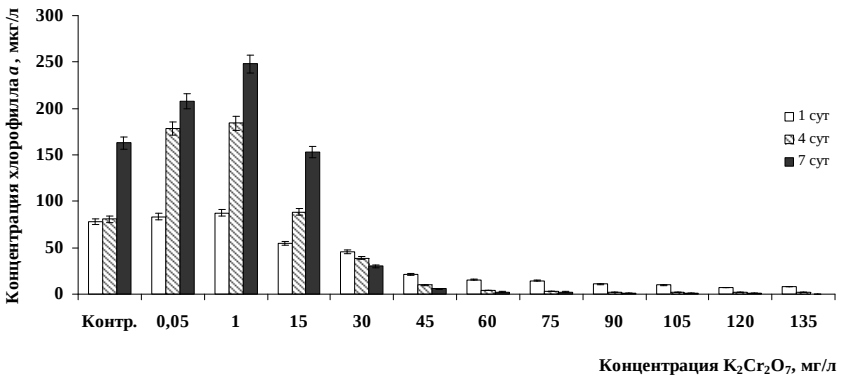

Рис. 3. Влияние $K_2Cr_2O_7$ на изменение концентрации хлорофилла *a* в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

Первичные процессы взаимодействия загрязняющих веществ различной химической природы сопровождаются функциональными реакциями, определяющими развитие компенсаторно-адаптивных изменений, направленных на

сохранение жизнеспособности клеток водоросли. Сравнительный анализ данных показывает, что адаптация водорослей к среде с хромом осуществляется в первую очередь благодаря функциональным изменениям, например фотосинтетической системы (Дмитриева и др., 2002).

Через 1 сут после добавления бихромата калия в культуральную среду (при его концентрациях 0,05 и 1 мг/л) количество хлорофилла *a* повысилось на 14 % по сравнению с контролем (рис. 3). Начиная с концентрации 15 мг/л наблюдалось последовательное снижение пула хлорофилла *a* на 17 % по сравнению с контролем. Такая тенденция сохранялась при увеличении времени контакта с бихроматом калия до 4-7 сут. Через 4 сут контакта с $K_2Cr_2O_7$ для концентраций более 15 мг/л отмечено резкое снижение количества хлорофилла *a* – на 45 % по сравнению с контролем. Через 7 сут контакта этот показатель уменьшался на 25 % по сравнению с контролем.

Динамика изменений показателя потенциальной фотосинтетической активности исследованных клеток свидетельствует о том, что при низких концентрациях $K_2Cr_2O_7$ водоросли могут адаптироваться к токсиканту (рис. 4). При увеличении времени контакта с токсикантом до 7 сут наблюдались пульсирующие изменения уровня этого показателя при различных концентрациях бихромата калия, что свидетельствовало о том, что культура водоросли ослаблена, темпы роста ее заметно снижаются. Максимальной концентрацией бихромата калия, которую способна выдержать культура *Ch. reinhardtii*, может быть 1 мг/л. При повышении этой концентрации клетки сильно повреждаются, что отмечается и на уровне фотосинтетической активности водоросли.

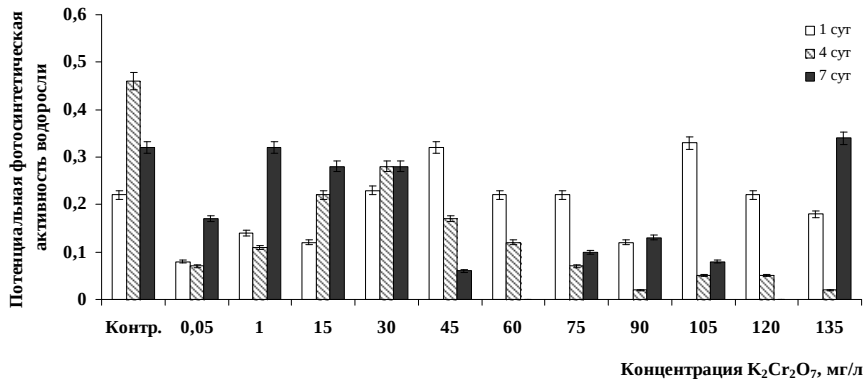

Рис. 4. Изменение потенциальной фотосинтетической активности клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. в зависимости от различных концентраций $K_2Cr_2O_7$ в культуральной среде

Культура *Ch. reinhardtii*, находящаяся на логарифмической стадии развития, оказалась очень удобным и чувствительным тест-объектом для определения токсичности бихромата калия. Учитывая то, что шестивалентный хром физически, химически и биохимически более стабилен в окисленных условиях поверхностных

вод, чем другие соединения металлов (например, меди), его соединения можно использовать в качестве эталонных для оценки токсичности вод (Travieso et al., 1999). В связи с этим бихромат калия используется в мировой практике как эталонный токсикант при оценке токсичности морской и пресной воды (UCO 6341-82, USO 8692, PD 118-02-90). Однако в качестве стандартного тест-объекта в большинстве стран используют в основном хлорококковую водоросль *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. (Дмитриева и др., 2002), с помощью которой устанавливают предельно допустимые концентрации и ориентировочно безопасный уровень воздействия (ОБУВ) при оценке степени загрязнения природных и токсичности сточных вод (PD 118-02-90, 1991).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что культура *Ch. reinhardtii* может быть перспективным тест-объектом для оценки токсичности бихромата калия и других токсикантов. Особенно важно то, что в качестве тест-реакции этой микроскопической водоросли может быть использована также подвижность клеток. Скорость движения клеток *Ch. reinhardtii* постепенно снижается при увеличении концентрации через 1 сут контакта с бихроматом калия (рис. 5). При концентрациях бихромата калия более 60 мг/л их движение полностью прекращается. Четко прослеживается также усиление токсичности бихромата калия при увеличении времени контакта с ним водорослей. Четверо суток контакта с бихроматом калия в концентрации выше 45 мг/л оказались летальными для *Ch. reinhardtii*. Через 7 сут прекратилось движение клеток при концентрациях выше 30 мг/л. В этих условиях наблюдалось также последовательное снижение энергозатрат клетки (рис. 6) при увеличении концентрации бихромата калия и продолжительности контакта с ним водорослей.

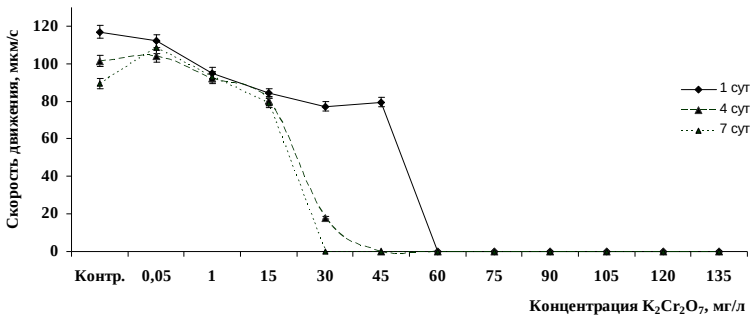

Рис. 5. Изменение скорости движения клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. в зависимости от различных концентраций $K_2Cr_2O_7$

По-видимому, одним из возможных защитных механизмов клеток микроводорослей в условиях действия токсического фактора может быть повышение энергозатрат, необходимых для осуществления движения клеток. В природной воде такой механизм способствует перемещению клетки в зоны, в которых

действие токсического фактора отсутствует. Таким образом подвижность клеток водорослей способствует их выживанию в условиях влияния неблагоприятных химических факторов водной среды. Такой защитный механизм помогает выживанию клеток микроскопических водорослей лишь до определенных концентраций токсических веществ. При дальнейшем повышении содержания токсикантов, что наблюдалось в данном опыте, повреждается фоторецепторный аппарат и происходит резкое снижение энергозатрат клеток, а затем отмирание водорослей. Количество подвижных клеток в суспензии *Ch. reinhardtii* свидетельствует о том, что при увеличении концентрации бихромата калия подавляется также их двигательная активность (рис. 7).

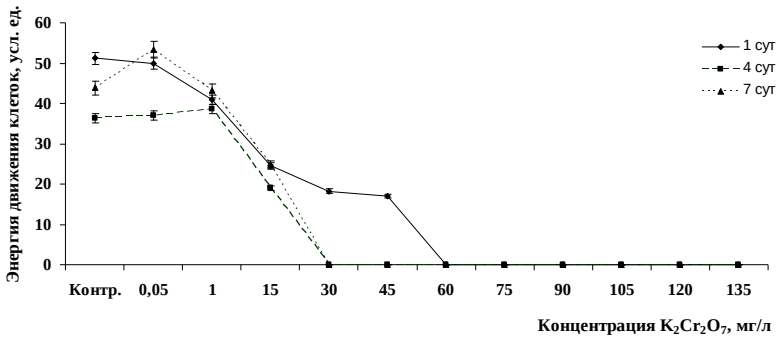

Рис. 6. Влияние различных концентраций $K_2Cr_2O_7$ на энергозатраты клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

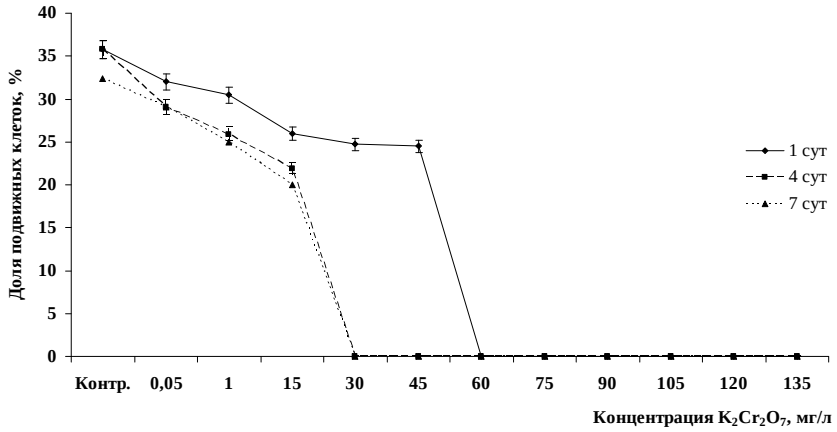

Рис. 7. Изменение доли подвижных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. при добавлении в культуральную среду различных концентраций $K_2Cr_2O_7$

Нарушение механизмов согласования процессов метаболизма клеток (образование и потребление продуктов фотосинтеза, рост и деление клеток, формирования деструктивных процессов) в конечном итоге может привести к гибели не только отдельно взятого организма, но и популяции в целом. Длительность адаптации водорослей при различных токсических воздействиях может быть разной – от нескольких секунд и минут до нескольких дней (Дмитриева и др., 2002). По-видимому, адаптация обеспечивает не только уровень толерантности, но и повышает устойчивость клеток к тому или иному токсическому фактору. Это время необходимо для активации ферментных процессов, участвующих в стабилизации метаболизма не только одной отдельно взятой клетки, но и популяции в присутствии повреждающего фактора.

Стадия формирования популяции микроводорослей определяет механизм их устойчивости к токсическому фактору (Гапочка, 1999). На ранних стадиях основным механизмом служит отбор, приводящий к элиминации клеток, перестройке структуры популяции и значительному повышению ее устойчивости. На более поздних стадиях формирования популяции одноклеточных организмов главным механизмом устойчивости к действию токсических веществ является фенотипическая адаптация популяции. Это значительно повышает устойчивость последней (на 1-2 порядка), сохраняет структуру в конкретных условиях среды и обеспечивает ей возможность возврата к исходному состоянию в условиях прекращения действия токсиканта. В процессе приспособления популяции микроскопических водорослей к возрастающим токсическим воздействиям прослеживается последовательная смена механизмов адаптации: фенотипическая адаптация клетки – фенотипическая адаптация популяции – генотипическая адаптация популяции – фенотипическая адаптация популяции – фенотипическая адаптация клетки. В этой смене происходит переход от нормального функционирования популяции к изменению ее структуры и восстановлению функционирования в экстремальных условиях.

Определенный интервал пороговых концентраций бихромата калия может служить критерием адаптационного потенциала клеток *Ch. reinhardtii* при хроническом воздействии этого токсиканта. Проведенная в эксперименте оценка порога чувствительности позволяет рассчитать экологически допустимую концентрацию токсиканта, которая позволит сохранить жизнеспособность клеток при конкретном уровне численности. Таким образом, увеличение интервала пороговых концентраций в процессе формирования популяции может свидетельствовать о повышении адаптационного потенциала клеток микроводорослей.

Заключение

В результате проведенных исследований установлены уровни сублетальных (1-15 мг/л) и летальных (свыше 30 мг/л) концентраций $K_2Cr_2O_7$ для жизнедеятельности пресноводной подвижной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang.

При всех исследуемых концентрациях $K_2Cr_2O_7$ происходит накопление токсиканта в клетках водорослей как на первые, так и на седьмые сутки контакта. Очевидно, что среди зеленых подвижных микроводорослей перспективен поиск эффективных концентратов тяжелых металлов. При проведении дальнейших экспериментов в этом направлении необходимо определить, какие факторы будут способствовать усилению или ослаблению процесса аккумуляции $K_2Cr_2O_7$.

Степень токсичности бихромата калия для водорослей существенно зависит не только от его концентрации в среде, но и от длительности контакта с токсикантом: чем он продолжительнее, тем существенней негативная реакция водоросли.

Среди исследуемых нами организмов по устойчивости к токсическому действию бихромата калия наиболее чувствительным тест-объектом являются клетки *Chlamydomonas renhardtii* Dang., находящиеся на логарифмической стадии роста. В качестве тест-реакции этой микроскопической зеленой водоросли могут быть использованы: скорость клеток, энергозатраты, необходимые для осуществления движения, а также определение доли подвижных клеток.

I.P. Novikova, [1], T.V.Parshikova [1], V.V.Vlasenko [2], I.B.Zubenko [3]

[1]Taras Shevchenko National University, 60, Volodimyrska St., 01017 Kyiv, Ukraine

[2]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine,

1, Murmanskaya St., 02094, Kyiv, Ukraine

[3]Institute of Hydrobiology NAS of Ukraine, 12 Geroyiv Stalingrada prosp.,

04210 Kyiv, Ukraine

CHANGE OF THE FUNCTIONAL STATE OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG. CELLS AT THE PRESENCE OF $K_2Cr_2O_7$ IN THE ENVIRONMENT

It was investigated an influence of $K_2Cr_2O_7$ on photosynthetic activity and cells mobility for green algae *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. It was established that even at low concentrations of $K_2Cr_2O_7$ cells of green algae are sensitive to its effect. Also it was determined lethal and sublethal concentrations of $K_2Cr_2O_7$ for *Ch. reinhardtii* cells.

K e y w o r d s : *Chlamydomonas reinhardtii*, $K_2Cr_2O_7$, potassium bichromate, quantity, chlorophyll *a* concentration, photosynthetic activity, mobility, energy consumption.

А. с. 1782125 Украина. Устройство для измерения параметров движения клеток / *А.А. Бегма, В.В. Власенко, В.И. Мацкивский и др.* / Заявл. 08.06.88. Опубл. 15.08.1992. Бюл. № 2. – 5 с.

Гандзюра В.П. Продуктивність біосистем за токсичного забруднення середовища важкими металами. – К.: Обрії, 2002. – 248 с.

Гапочка Л.Д. Популяционные аспекты устойчивости цианобактерий и микроводорослей к токсическому фактору: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1999. – 64 с.

Гольд В.М. Попельницкий В.А. Определение фотосинтеза микроводорослей флуоресцентным методом // Методические вопросы изучения первичной продукции планктона внутренних водоемов – М.: Гидрометеоиздат., 1993. – С. 25-29.

Дмитриева А.Г., Кожанова О.А., Дронина Н.Л. Физиология растительных организмов и роль металлов – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 160 с.

Квасников Е.И., Серпокрылов Н.С., Клюшникова Т.М. и др. Биологическая очистка хромсодержащих промышленных сточных вод. – Киев: Наук. думка, 1990. – 112 с.

Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. – Киев: Орион, 2000. – 320 с.

Линник П.Н., Лещинская А.А., Набиванец Б.И. О методических особенностях исследования сосуществования форм хрома в природных водах // Гидробиол. журн. – 1989. – **25**, № 2. – С. 88-93.

Романенко В.Д. Основы гидроэкологии. – Киев: Генеза, 2004. – 664 с.

Саенко Г.Н. Металлы и галогены в морских организмах. – М.: Наука, 1992. – 199 с.

Сиренко Л.А., Рыбак Н.В., Паршикова Т.В., Пахомова М.Н. Коллекция живых культур микроскопических водорослей (акроним коллекции – HPDP). – К.: Фитосоциоцентр, 2005. – 54 с.

Barsanti L., Gualtieri P. Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. – Boca Raton: CRC Press, 2005. – 320 p.

Travieso L., Canizares R.O., Borja R. et al. Heavy Metal Removal by Microalgae // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1999. – **62**. – P. 144-151.

Получена 16.10.07

Подписала в печать Е.И. Шнюкова