

Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах

© 2008. Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Т.Я. Ашихмина,
С.Ю. Огородникова, А. С. Олькова, А.И. Фокина

Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ

Доказана возможность использования четырёх штаммов цианобактерий (ЦБ) *Nostoc paludosum*, *Nostoc linckia*, *Nostoc muscorum*, *Microchaeta tenera* в качестве тест-организмов на загрязнение субстратов различными поллютантами. Критерием чувствительности цианобактерий является жизнеспособность клеток, которая определяется по образованию в них кристаллов формазана после обработки цианобактериальной суспензии ТТХ. Показано, что уровень устойчивости ЦБ к токсиканту зависит от титра используемой культуры.

The possibility of using strains of the four cyanobacteria *Nostoc paludosum*, *Nostoc linckia*, *Nostoc muscorum*, *Nostoc tenera* as test-organisms indicating substrates' contamination with different pollutants is proved. The cyanobacteria sensitivity criterion consists in cell vitality that is shown by phormasan crystallogenesis after treating cyanobacteria suspension with TTCh. It is shown that level of CB resistance to a toxicant depends on the titre of the culture used.

При биологическом мониторинге оценка степени загрязнения окружающей среды базируется на реакции организмов различных систематических уровней. При этом индикаторами внешнего воздействия могут быть как анатомо-морфологические, так и физиолого-биохимические показатели. Достоинства и недостатки методов биоиндикации и биотестирования неоднократно обсуждались [1 – 5]. Тем не менее, все используемые в биоиндикации биосистемы не обеспечивают в полной мере проведения экспресс-анализов на определение степени химического загрязнения окружающей среды.

Актуальность проблемы обостряется, в частности, тем, что в России уже пущены в строй или в ближайшее время в разных её регионах начнут действовать особо опасные в экологическом плане предприятия – объекты по уничтожению химического оружия. Потенциально они могут стать источником попадания в окружающую среду тяжёлых металлов (ТМ), соединений мышьяка, серы, фтор-, хлор-, фосфорорганических соединений и других поллютантов.

Цель нашей работы – проверить возможность использования цианобактерий (ЦБ) в качестве организмов-биотестеров на воздействие ксенобиотиков различной химической природы.

Среди фототрофных микроорганизмов эукариотные зелёные водоросли *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda* входят в перечень организмов, включённых в гостируемые методики, связанные с определением уровня загрязнения окружающей среды. В то же вре-

мя, на наш взгляд, эти водоросли не относятся к идеальным представителям организмов-биотестеров. Среди их недостатков в этом плане можно перечислить следующие: хлорелла, например, является одним из наиболее устойчивых в экологическом плане микрорототрофов, выдерживая значительный уровень загрязнения почвы и воды нитратами, ТМ, микотоксинами. Именно представители данного вида одними из первых поселяются на техногенных пустошах, вулканическом пепле и последними в ходе сукцессий выбиваются из фототрофных сообществ при действии загрязняющих веществ [6, 7]. Сценедесмус – организм, имеющий сравнительно узкий ареал, капризный в культивировании и кажется совсем случайным объектом, взятым для биотестирования.

Среди фототрофных микроорганизмов цианобактерии (прокариотные синезелёные водоросли=цианопрокариоты) занимают особое место. Именно они обладают наивысшим биотическим потенциалом, в массе развиваясь и в почве и в воде. Среди них встречаются как особо стойкие, так и наиболее чувствительные к внешним воздействиям штаммы. Их сравнительно легко выделить в альгологически чистую культуру из окружающей среды, так как многие виды фактически являются монодоминантными культурами при «цветении» воды и почвы. С ними проще работать, чем с другими прокариотами вследствие естественной окраски и более крупных размеров, и проще, чем с водорослями, так как они не имеют целлюлозной клеточной стенки и обладают гораздо большим разнообразием путей метаболизма.

В данной работе использовали штаммы цианобактерий из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры ботаники, физиологии растений и микробиологии Вятской ГСХА. Среди цианобактерий, используемых в данном исследовании, было 3 вида ностока и один вид микрохеты. Приводим краткую характеристику видов, согласно определителю М.М. Голлербаха и др. [8].

Nostoc paludosum Kütz. №18. Колонии микроскопические, мелкие или едва заметные простым глазом, до 0,5 мм в поперечнике, слизистые, без крепкого перидерма, синезелёной или желтоватой окраски. Трихомы рыхлолежащие, бледносинезелёные, (2,5) 3,0–3,5 (4,0–4,5) мкм ширины. Клетки бочонкообразные, реже эллипсоидные 4,6 мкм ширины. Споры эллипсоидные, реже – почти шаровидные, 4,0–4,5 (6) мкм ширины и 6–8 (9) мкм длины, с гладкой бесцветной или слегка коричневой оболочкой.

Данный штамм изолирован Г.Н. Перминовой из дерново-подзолистой почвы на целинном участке опытного поля ВГСХА.

Nostoc linckia (Roth.) Born. et Flah. №271. Колонии сначала шаровидные, потом неправильно распростёртые, слизистые, синевато-зелёной, грязно-зелёной или коричневой окраски. Влагалища бесцветные, ясно заметные только на периферии колоний. Трихомы сильно извитые, густо переплетающиеся, бледно синезелёные, 3,5–4 (4,7) мкм в ширину. Клетки бочонкообразные, длина их равна, несколько меньше или больше ширины, 6–7 мкм ширины и 7–8 мкм длины, с гладкой коричневой или, очень редко, бесцветной оболочкой.

Выделение штамма в чистую культуру провела А.Л. Ковина из дерново-подзолистой почвы Учхоза ВГСХА.

Nostoc muscorum (Ag.) №13. Колонии сначала шаровидные, потом плоско распростёртые, 2–5 см в поперечнике. Влагалища хорошо заметны только на периферии, жёлтокоричневые. Трихомы тесно переплетающиеся, 3–4 (5) мкм ширины. Клетки коротко бочонкообразные или цилиндрические, иногда длина их до 2 раз превышает ширину. Гетероцисты почти шаровидные, 6–7 мкм в диаметре. Споры удлинённые, 4–8 мкм ширины и 8–12 мкм длины, с гладкой жёлтой оболочкой.

Оригинатор вида – А.Н. Третьякова. Штамм выделен из чернозёмов Курской области.

Microchaete tenera Thur №265. Нити различно изогнуты, 6–8 мкм ширины и до 1 мм длиной, одиночные или соединённые в небольшие группы. Влагалища гомогенные, тонкие, бесцветные. Трихомы 4–6 мкм ширины. Клет-

ки у основания нитей прямоугольно-цилиндрические, без перетяжек у поперечных перегородок, на вершинах нитей сильно укорачивающиеся, более или менее бочонкообразные, перешнурованные у поперечных перегородок. Гетероцисты базальные и интеркалярные, такой же ширины, как и прилежащие к ним вегетативные клетки. Споры цилиндрические, 6–7,5 мкм ширины и 13–17 мкм длиной, с коричневой оболочкой, одиночные или по две рядом.

Вид выделен А.Л. Ковиной из паркового газона г. Кирова.

В музейной культуре цианобактерии подерживаются в пробирках на агаризованной среде Громова №6 без азота. Для экспериментальной работы, как правило, их культивируют в люминостатах при 8–10-часовом дополнительном освещении в конических колбах Эрленмейера объёмом 500 мл на жидкой безазотистой среде Громова №6. Доказано, что высшая жизненная активность ЦБ характерна для 4–8-недельных культур. В этот период популяции ЦБ находятся на логарифмической (экспоненциальной) фазе развития, имеют минимальную численность отмерших клеток, в среде ещё не накапливаются метаболиты, вызывающие аутоингибирование культуры. Использование безазотистой среды обусловлено тем, что все испытываемые штаммы ЦБ являются азотфиксаторами и не нуждаются для своей жизни в связанных соединениях азота.

Для определения уровня токсического воздействия на ЦБ ксенобиотиков мы применяли модификацию тетразолю-топографического метода определения дегидрогеназной активности живых клеток. При этом в качестве субстрата использованы бесцветные соли тетразолия, в частности, 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), который, акцентируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ), имеющий красную или малиновую окраску [9].

При количественном определении дегидрогеназной активности, например, почвенной вытяжки, количество формаза измеряют колориметрически. В случае выявления жизнеспособности семян подсчитывают процент окрашенных зародышей. В свое время жизнеспособность клеток ЦБ при выращивании их на средах с антибиотиками определяли под микроскопом по наличию в клетках малиновых кристаллов формаза [10].

Именно эту методику мы положили в основу нашей работы по установлению уровня токсичности сред с помощью ЦБ, внося существенные дополнения и изменения, связанные с пред-

варительной подготовкой культур, унификацией микроскопических измерений, определением титра клеток, при котором культура наиболее чувствительна к токсиканту и т. п.

Наша методика включала следующие этапы работы:

1. Подготовительный этап сводился к наращиванию необходимой биомассы ЦБ путём внесения инокулята в стерильную питательную среду с последующей экспозицией в люминестате.

2. Для работы с токсикантами образующуюся биоплёнку ЦБ разбивали на гомогенизаторе Homogenizer type 302 (9000 оборотов в минуту), так как в жидкой среде все испытанные штаммы по мере роста приобретают текстуру в виде псевдоткани, состоящей из переплетенных трихомов и нитей. Работа с ненарушенной биоплёнкой очень затруднена, так как доступ токсикантов к отдельным клеткам неравномерный, и при микроскопировании мазков невозможен просмотр препарата в одной плоскости. Мы выбрали такой режим гомогенизации, при котором разрушалась перидерма трихомов, достигался выход отдельных нитей, но не повреждались отдельные клетки.

3. В приготовленной суспензии подсчитывали титр клеток и в случае необходимости разбавляли дистиллированной водой до нужной концентрации.

4. Полученную однородную суспензию подвергали центрифугированию на центрифуге High speed centrifuge type 310 в том объёме культуры, который в дальнейшем использовался для закладки одного варианта опыта.

5. Среда, в которой выращивали ЦБ, сливалась после центрифугирования, и концентрат клеток помещали в испытуемый токсикант, в ту ёмкость (колбы или пенициллиновые пузырьки), в которых проводили дальнейшую экспозицию с токсикантом.

6. Экспозиция культур на свету продолжалась в течение 19–20 часов, затем несколько раз проводили отмывку культуры ЦБ от токсиканта путём центрифугирования или дистиллированной водой, или средой Громова в зависимости от цели опыта.

7. В оставшуюся после промывания массу цианей добавляли 0,075% раствор ТТХ и выдерживали 3 часа.

8. Готовили мазки на предметных стёклах (3-кратная повторность из каждого варианта) и с помощью иммерсионного микроскопа просчитывали не менее 500 клеток в каждой повторности, дифференцируя клетки с ярко-красными кристаллами формаза внутри

(считая их жизнеспособными с выраженной дегидрогеназной активностью) и клетки без кристаллов (считая их неактивными и нежизнеспособными).

В ходе эксперимента на токсичность в водном растворе испытывали соли свинца (Pb), мышьяка (As) и метилфосфоновой кислоты (МФК).

Результаты и обсуждение

Влияние свинца на жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum*

В данном опыте токсикант (ацетат свинца) вносился непосредственно в среду Громова, в которой популяция отмывалась после центрифугирования. Выбранные концентрации соответствовали 100, 1000, 100000 и 200000 ПДК (30, 300, 30000, 60000 мг/л) по свинцу для водной среды. В ходе экспозиции культуры в течение 20 часов уже визуальный осмотр контрольных и опытных колб показал резкое различие в окраске растворов. Так, в контрольном варианте и при 100 ПДК окраска была ярко-красной, 1000 ПДК – розовой, 100000 ПДК – бледно-розовой и при 200000 – окраска полностью отсутствовала. Данные внешнего осмотра полностью соответствуют результатам микроскопического исследования, которые приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, повышение концентрации Pb приводит к резкому снижению дегидрогеназной активности клеток. Замена при отмывании и экспозиции питательной среды Громова дистиллированной водой понижала устойчивость клеток к токсиканту (табл. 2).

Сравнение результатов, приведённых в табл. 1 и 2, показывает, что клетки популяции ЦБ в том случае, когда экспозиция происходит не в питательной среде, а в дистиллированной воде, более чувствительны к действию токсиканта. Поэтому при диагностике загрязнения природных сред (почвенной вытяжки, воды) желательнее использовать воду для отмывания при центрифугировании и экспозиции выбранного титра клеток. Данный показатель (титр клеток) также играет существенную роль в чувствительности клеток к токсиканту, что было выявлено при действии одной и той же концентрации свинца на популяцию *N. paludosum* с разным титром (табл. 3).

Плотность популяции служит существенным фактором, обеспечивающим её устойчивость во внешней среде. Это может быть связано с экссудацией слизистых метаболитов, которые являются одним из механизмов удер-

Таблица 1

Влияние свинца на жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum* (%) при экспозиции в среде Громова

Вариант	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
Контроль	98,09±0,62	1,90
100 ПДК	95,79±0,91	4,21
1000 ПДК	82,08±7,05	17,92
100000 ПДК	5,99±1,9	94,01
200000 ПДК	3,35±1,9	96,65

Таблица 2

Влияние свинца на жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum* (%) при экспозиции в дистиллированной воде

Вариант	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
Контроль	91,47±1,5	8,54
100 ПДК	88,2±3,16	11,8
1000 ПДК	18,45±4,59	81,55
10000 ПДК	17,07±6,74	82,92
50000 ПДК	11,12±1,6	88,87
100000 ПДК	4,93±0,34	95,06

жания и обезвреживания токсикантов. Поэтому в целях повышения чувствительности популяции ЦБ в качестве организмов-биотестов необходимо дополнительно к экспозиции в воде использовать существенные разбавления гомогенизированной популяции не менее, чем в 100 раз, добиваясь плотности клеток в пределах 1–2 млн./мл.

Влияние мышьяка на жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum*

В данной серии опытов в качестве токсиканта использовался хлорид мышьяка. Соединения мышьяка являются продуктами разложения таких видов химического оружия, как люизит и двойные иприт-люизитные смеси, потенциально могут оказаться в почве в ходе эксплуатации объектов хранения и уничтожения химического оружия. Выявлена тенденция снижения жизнеспособности клеток по мере увеличения концентрации мышьяка (табл. 4).

При концентрации As 0,1 мг/мл клетки ЦБ полностью утрачивают дегидрогеназную активность. Таким образом, *N. paludosum* может быть использован в качестве тест-организма на наличие данного поллютанта в окружающей среде.

Влияние метилфосфоновой кислоты (МФК) на жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum*

МФК является одним из продуктов разложения химического оружия, содержащего фосфорорганические компоненты. Опыты, проведенные с данной культурой ЦБ при экспозиции клеток с токсикантом в среде Громова и дистиллированной воде, выявили такую же тенденцию, как и по свинцу: жизнеспособность клеток существенно выше с использованием питательной среды и, наоборот, повышается процент нежизнеспособных клеток при их экспозиции с токсикантом в воде (табл. 5).

Таблица 3

Влияние титра клеток *Nostoc paludosum* на выживаемость (%) в растворе ацетата свинца (100 ПДК Pb)

Титр клеток/мл	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
2,21·10 ⁸	88,2±3,16	11,8
2,21·10 ⁷	44,55±2,1	55,44
4,42·10 ⁶	21,6±3,7	78,37
2,21·10 ⁶	11,17±0,18	88,83

Таблица 4

Влияние мышьяка на жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum* (%)

Вариант (As, мг/мл)	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
Контроль (вода дистиллированная)	93,93±93	6,07
10 ⁻⁴	94,59±2,05	5,41
10 ⁻³	95,43±4,8	4,57
10 ⁻²	25,48±7,31	74,52
10 ⁻¹	0	100

На выживаемость клеток в растворе МФК оказывает влияние и титр клеток, а именно: устойчивость популяции понижается с понижением плотности клеток (табл. 6).

Влияние МФК на жизнеспособность различных видов цианобактерий

Следующая серия опытов была связана с выявлением наиболее чувствительных видов цианобактерий к МФК. Характеристика испытуемых штаммов приведена выше. Результаты тетразолюно-топографического метода определения жизнеспособности клеток представлены в таблице 7.

Исходя из полученных результатов, шкала толерантности испытанных видов колеблется в пределах 20% выживаемости. К МФК наиболее чувствительным видом оказалась *M. tenera*, а наиболее стойким – *N. paludosum*. Два других вида ностока занимают место между этими полюсами и обладают практически одинаковой стойкостью к МФК.

Таким образом, любой из 4-х штаммов ЦБ может быть использован в биотестирова-

нии с применением тетразолюно-топографического метода [11, 12].

В частности, данный метод применили для биотестирования проб снеговой воды и почвенных вытяжек, отобранных в точках экологического мониторинга вблизи объекта уничтожения химоружия «Марадыковский» Кировской области. Программа экологического мониторинга ОУХО включает 155 точек контроля и мониторинга, из них 53 входят в санитарно-защитную зону объекта на территории радиусом 2 км. Результаты биотестирования приведены в таблице 8.

Сравнение полученных данных по культуре ЦБ с результатами биотестирования по гостированным методикам с использованием дафний, инфузорий и хлореллы показало большую чувствительность цианобактерий. При цианобактериальном анализе отмечена слабая токсичность снеговой воды и почвенной вытяжки в трех точках (34, 37, 40), тогда как биотесты с «официальными» организмами выявили умеренную токсичность снеговой воды в точках 34 и 40 только

Таблица 5

Влияние МФК на гибель клеток *Nostoc paludosum* (%) при экспозиции в среде Громова и воде

Вариант (МФК, моль/л)	Среда Громова	Дистиллированная вода
Контроль	0,96	24,8
10 ⁻⁴	1,61	30,6
10 ⁻³	90,03	97,6
10 ⁻²	100	100

Таблица 6

Влияние титра *Nostoc paludosum* на выживаемость (%) популяции в растворе МФК с концентрацией 1·10⁻⁴ моль/л

Титр <i>N. paludosum</i> , кл./мл	Жизнеспособные клетки	Нежизнеспособные клетки
2,21·10 ⁸	98,39±1,29	1,61
2,21·10 ⁷	91,7±2,14	7,15
4,42·10 ⁶	88,41±3,17	11,59
2,21·10 ⁶	70,04±16,4	29,96

Таблица 7

Влияние МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на жизнеспособность (%) клеток различных видов цианобактерий

Вид цианобактерий	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
<i>Nostoc paludosum</i>	91,56±2,07	8,44
<i>Nostoc linckia</i>	79,27±2,54	20,73
<i>Nostoc muscorum</i>	78,65±12,4	21,35
<i>Microchaete tenera</i>	70,5±6,0	29,50

Таблица 8

Жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum* (%) в тестируемых объектах

Объект	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
Дистиллированная вода	83,86±1,73	16,14
Снеговая вода		
Точка 34	49,23±4,24	50,77
Точка 37	59,25±1,63	40,75
Точка 40	77,01±3,48	22,99
Почвенная вытяжка		
Точка 17	73,17±3,42	26,83
Точка 18	78,7±8,79	21,3
Точка 27	82,17±3,37	17,83
Точка 40	64,67±1,43	35,33

по реакции инфузорий и полную нечувствительность хлореллы и дафний. Следовательно, ЦБ могут быть существенным дополнением к сертифицированным методикам при биотестировании объектов окружающей среды на различные виды загрязнений. Мы считаем, что предложенный нами тетразольно-топографический метод определения дегидрогеназной активности в клетках цианобактерий может успешно функционировать в системе биологического мониторинга окружающей среды.

Литература

1. Шуберт Р. (ред.) Биоиндикация загрязнений наземных экосистем. М.: Мир, 1988. 350 с.
2. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга. М.: Изд-во МГУ, 1985. 158 с.
3. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров, 2002. 544 с.
4. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар, 2005. 336 с. (Коми НЦ УрО РАН).
5. Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Дабах Е.В., Кантор Г.Я., Калинин А.А., Варакина А.И., Огородникова С.Ю. Эколого-аналитический мониторинг антропогенно-нарушенных территорий // Вестник Вятского государственного гуманитарного университета, 2006. №14. С.153-169.
6. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 143 с.
7. Домрачева Л.И., Панкратова Е.М., Перминова Г.Н. Оценка биологического состояния почвы по её «цветению» // Почвоведение, 1992. №11. С.71-80.
8. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР, Выпуск 2. М.: Советская наука, 1953. 652 с.
9. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.
10. Калинин А.А. Цианобактерии как возможные компоненты diaзотрофных микробных ассоциаций и их влияние на растения: Автореф. дис. ... канд биол. наук. М., 1995. 23 с.
11. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Фокина А.И., Пегушина О.А. Альго-цианобактериальные комплексы в диагностике состояния почвы, загрязнённой свинцом и метилфосфоновой кислотой // Современные проблемы загрязнения почв: Матер. II междунар. науч. конф. Москва, 2007. Т. 2. С. 341-343.
12. Ашихмина Т.Я., Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю. Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие на микроорганизмы, ферментативную активность почв и высшие растения // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 2. С. 78-87.