

Адаптация почвенных цианобактерий и водорослей к воздействию свинца в лабораторных условиях

© 2010. А. Д. Темралеева, аспирант, Д. Л. Пинский, д.б.н., зам. директора, Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, e-mail: temraleeva_anna@mail.ru

Исследованы адаптации почвенных цианобактерий и водорослей к воздействию свинца в модельном эксперименте. Показан стимулирующий эффект ацетата свинца (300 мг/кг) на альго-цианобактериальное сообщество. Сделан вывод, что сохранность альго-цианобактериального сообщества при загрязнении почвы достигается с помощью комплекса одновременно действующих и взаимодополняющих друг друга адаптационных механизмов на организменном и ценотическом уровнях организации.

During the experiment adaptation of soil cyanobacteria and algae to the influence of lead was investigated. Stimulating effect of 300 mg/litre of lead on cyanobacterial community is shown. Thus, in conditions of soil contamination, algae-cyanobacteria community is preserved due to the complex of operating at the same time and mutually complementary adaptation mechanisms on organismal and on coenotic levels of organization.

Ключевые слова: цианобактерии, водоросли, адаптация, тяжёлые металлы, серая лесная почва

Key words: cyanobacteria, algae, adaptation, heavy metals, grey forest soil

Экотоксикологические исследования обеспечивают природоохранную практику знаниями, необходимыми для оценки актуальной и потенциальной опасности загрязнения и контроля за состоянием среды. Очевидно, что без глубокого и детального изучения поведения загрязняющих веществ в почве и ответных реакций живых организмов на токсическую нагрузку невозможно обосновать систему критериев оценки состояния почв и соответственно контроля. Одной из перспективных групп почвенных организмов-индикаторов являются водоросли и цианобактерии. Они составляют неотъемлемую часть почвенной биоты, имеют многочисленные трофические и топические связи, участвуют в почвообразовательном процессе, обладают специфической чувствительностью к различным видам антропогенного воздействия и быстрой ответной реакцией на изменение экологической ситуации. Однако широкому внедрению биоиндикационных систем на основе альго-цианобактериальных сообществ (АЦС) препятствует недостаточная изученность некоторых аспектов токсического воздействия тяжёлых металлов на почвенные цианобактерии и водоросли. В частности, мало изучен вопрос о механизмах и степени адаптации цианобактерий и водорослей к тяжёлым металлам, хотя высокие адаптивные способности АЦС снижают их индикационные возможности, что приводит к искажению ре-

зультатов биомониторинга. Под адаптацией в данном случае понимается любое структурное или функциональное изменение организма, популяции, сообщества, повышающее шанс на выживание конкретной популяции и всего вида в целом [1].

Целью данной работы является исследование адаптаций почвенных цианобактерий и водорослей к воздействию свинца в модельном эксперименте.

Объекты и методы

Влияние свинца на цианобактерии и водоросли серой лесной почвы ($pH_{\text{водн.}} 4,95$) изучали в условиях лабораторного эксперимента. Отбор почвы проводили на стационарной пробной площадке во вторичном мелколиственно-широколиственном разнотравном лесу общепринятыми почвенно-альгологическими методами [2, 3]. Собранные образцы почвы высушивали до воздушно-сухого состояния, измельчали, просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм и тщательно перемешивали для устранения гетерогенности пробы. Изучение действия свинца на характеристики АЦС проводили в водно-почвенной культуре (почва:вода в соотношении 1:3). Такое соотношение было выбрано на основе предварительного эксперимента как наиболее удобное для химико-биологического

анализа всех компонентов системы. Для этого в стерильные бюксы вносили по 7 г почвы и по 21 мл стерильной дистиллированной воды. Свинец в форме ацетата вносили однократно в концентрациях: 300, 750, 1500 мг/кг почвы в пересчёте на катион. Эти концентрации соответствовали среднему, высокому и очень высокому уровню загрязнения для почв со слабокислой и кислой реакцией [4]. Контроль оставался чистым (без внесения соли). Фоновое содержание свинца в образцах составляло $14,2 \pm 2,97$ мг/кг почвы. После внесения токсиканта образцы перемешивали в течение 1 часа. Повторность опытов трёхкратная. Далее водно-почвенные культуры инкубировали при температуре 23–25°C и круглосуточном освещении 2500 лк. Спустя 2 месяца производили отделение образовавшегося на поверхности воды АЦС путем его осаждения на мембранном фильтре при вакуумном фильтровании жидкой фазы системы.

Изучали следующие показатели, отражающие реакцию организмов на разных уровнях биологической организации: содержание общего хлорофилла и морфологические изменения – организменный уровень; общее и таксономическое обилие, скорость формирования АЦС, количество видов и видовой состав водорослей и цианобактерий – ценотический уровень. Контроль пигментного комплекса цианобактерий и водорослей осуществляли по изменению содержания общего хлорофилла (сумма хлорофиллов *a*, *b*, *c*) спектрофотометрическим методом. Хлорофилл извлекали ацетоновой экстракцией (ГОСТ 17.1.4.02 – 90) и анализировали на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) при длинах волн 630, 647, 664 и 750 нм.

Для видовой идентификации цианобактерий и водорослей брали несколько соскобов с поверхности АЦС и фиксировали в 4% формалине. При микроскопировании использовали микроскопы MC-200 TV (Австрия) и Axioscope Carl Zeiss с люминесцентной приставкой (Германия) (увеличение $\times 640$, $\times 1600$) и отечественные и зарубежные определители [5 – 11]. Общее и таксономическое обилие водорослей оценивали по частоте встречаемости видов, используя шестибалльную шкалу [12]: 1 – единично (менее 10 индивидов в препарате), 2 – редко (10 индивидов в препарате), 3 – нередко (1–10 индивидов в ряду препарата), 4 – часто (11–25 индивидов в ряду препарата), 5 – очень часто (25–50 индивидов в ряду препарата), 6 – в массе (более 50 индивидов в ряду препарата). Кроме того, в опыте с максималь-

ным внесением свинца проводили посев грибного мицелия с включением спор водорослей и цианобактерий на твердую питательную среду BG-11 с азотом (рН 7,0) с целью определения видовой принадлежности последних.

Содержание свинца в почве определяли с помощью рентген-флуоресцентного спектрометра «Спектроскан МАКС GV» (Россия). Статистический анализ полученного материала проводили с применением программного пакета Statistica 6.1. Были рассчитаны средние значения величин и стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение

Адаптация к влиянию свинца на уровне организма связана с совокупностью морфологических, физиологических и биохимических реакций, направленных на предупреждение проникновения металла в клетку, а также на эндогенную детоксикацию загрязнителя. В первом случае сорбционным барьером служат слизистые чехлы и капсулы водорослей, состоящие из сложных полисахаридов, в состав которых входят полярные ОН-, СООН-, SO_3H -группы, способные связывать ионы металлов [13 – 16]. В нашем исследовании АЦС, выращенные на среде с добавлением дозы свинца 1500 мг/кг, визуально отличались от контрольного и остальных опытов появлением более обильной слизи и увеличением размеров слизистых чехлов (рис. 1, см. цветную вкладку). Очевидно, эти морфологические изменения направлены на предотвращение поступления токсиканта в клетку. Такой превентивный механизм описан в ряде работ [17, 18].

Кроме того, при концентрации свинца 1500 мг/кг было отмечено изменение окраски клеток водорослей и цианобактерий до бледно-зелёного или желтоватого цвета (рис. 1, см. цветную вкладку), что, очевидно, свидетельствует об ингибировании биосинтеза хлорофилла. Подобные хлоротические явления, вероятно, вызваны угнетением активности ферментов и усилением перекисного окисления липидов [19, 20]. Данные о содержании общего хлорофилла подтверждают это предположение: концентрация общего хлорофилла цианобактерий и водорослей значительно уменьшилась ($p < 0,05$) при внесении свинца в дозах 750 и 1500 мг/кг почвы по сравнению с контролем и дозой свинца 300 мг/кг (табл.). Минимальная концентрация хлорофилла АЦС, подвергавшегося воздействию максимальной

Влияние свинца на интенсивность «цветения» почвы

Опыт	Время, недели	Количество видов	Обилие, баллы	Содержание общего хлорофилла, мкг/л
Контроль	2	9(Cyan ₆ Chloro ₃)	32(Cyan ₁₉ Chloro ₁₃)	2,25±0,32
300 Pb(Ac) ₂	4	9(Cyan ₃ Chloro ₄)	26(Cyan ₁₆ Chloro ₁₀)	7,97±2,80
750 Pb(Ac) ₂	5	8(Cyan ₄ Chloro ₃ Xant ₁)	24(Cyan ₁₀ Chloro ₁₁ Xant ₃)	0,61±0,35
1500 Pb(Ac) ₂	6	6(Cyan ₄ Chloro ₂)	18(Cyan ₁₄ Chloro ₄)	1,21±0,71

дозы свинца, объясняется преобладанием старых, отмирающих и мёртвых клеток цианобактерий и водорослей, что было отмечено при световом и люминесцентном микроскопировании (рис.1, см. цветную вкладку).

С другой стороны, содержание общего хлорофилла в опыте с минимальной токсической нагрузкой значимо ($p < 0,05$) превысило соответствующий показатель в контроле. Подобный стимулирующий эффект ацетата свинца при внесении дозы 300 мг/кг может вызываться несколькими причинами (рис. 2, см. цветную вкладку). Во-первых, предполагается, что в присутствии тяжёлого металла происходит увеличение синтеза органических хелаторов, направленное на обеспечение меньшей доступности и, следовательно, токсичности загрязнителя, что наблюдалось для многих видов цианобактерий в исследованиях [21, 22]. С другой стороны, гиперпродукция органики может стимулировать массовое развитие бактерий-спутников водорослей. Кроме того, сам ацетат является легкодоступным источником энергии для бактерий, что стимулирует их рост, а интенсивное бактериальное выделение углекислого газа увеличивает фотосинтетическую активность цианобактерий и водорослей [23]. Вместе с тем многие виды водорослей способны к фотогетеротрофному типу питания, и присутствие дополнительного органического источника углерода снижает токсический эффект тяжёлого металла, как показано в работе [24] по изучению влияния ртути на некоторые виды зелёных водорослей в присутствии глюкозы и глутамата. Предполагаемые механизмы влияния ацетат-аниона на АЦС серой лесной почвы отражены на схеме (рис. 2, см. цветную вкладку).

Адаптация к токсическому воздействию свинца на ценоотическом уровне отражается в изменении характеристик сообщества (возраст, темпы роста, видовой состав и др.). Внешним проявлением адаптации АЦС является появление или заметное ускорение роста и размножения после замедления роста культуры под действием тяжёлого металла

[25]. Так, при добавлении максимальной концентрации свинца на второй неделе эксперимента на поверхности водной среды появились прозрачные студенистые пленки. При их микроскопировании было обнаружено, что пленка представляет собой грибной мицелий с многочисленными покоящимися клетками цианобактерий и водорослей. Аналогичный пример наблюдался при внесении свинца 8 ммоль/л с обнаружением полностью бесцветного мицелия [26]. С целью видовой идентификации обнаруженных водорослей и цианобактерий на пятой неделе эксперимента образцы грибного мицелия были посеяны на чашки Петри с твердой питательной средой BG-11 с азотом (pH 7,0). В результате были определены следующие виды водорослей: *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard, *Chlorella vulgaris* Beijerinck и *Spongiochloris minor* Chantanachat & Bold, а также цианобактерия *Nostoc muscorum* C. Agardh ex Bornet & Flahault. Морфологических изменений особей обнаружено не было: клетки имели естественные размеры, окраску и форму.

Торможение жизненной активности может рассматриваться в данном случае как наиболее общая и стратегически прогрессивная ответная реакция организма на любое стрессовое воздействие [27], так как покоящиеся клетки способны переживать такие неблагоприятные условия, при которых обычные вегетативные клетки погибают, и, следовательно, выполнять функцию сохранения жизни в токсичной среде. Кроме того, гибель спор на порядок меньше смертности вегетативных клеток [28]. В целом для сообщества уменьшение количества водорослей – процесс обратимый и гибель определенной части особей – вполне нормальное явление, так как пул спор водорослей служит гарантией сохранения сообщества в условиях токсического воздействия свинца. При уменьшении влияния стресс-фактора, которое в нашем случае обеспечивалось сорбцией свинца почвой, экзометаболитами, слизями и мёртвыми клетками водорослей, покоящие-

ся клетки перешли к вегетации и размножению, восстановив численность сообщества, что проявилось в вытеснении грибного мицелия цианобактериями и водорослями. Время отставания «цветения» водорослей в опытах от контроля зависело от уровня токсической нагрузки: массовое и визуально заметное «цветение» наблюдалось на две, три и четыре недели позже при внесении свинца в концентрациях 300, 750 и 1500 мг/кг соответственно по сравнению с контролем (табл.).

Кроме того, адаптация к неблагоприятным условиям окружающей среды на ценотическом уровне может проявляться в образовании АЦС, структурная и функциональная организация которого способна противостоять стрессовым ситуациям и экстремальным воздействиям. Так, анализ видового состава и структуры АЦС в контроле и опытах выявил уменьшение количества видов и обилия водорослей, изменения в соотношении разных таксонов водорослей при увеличении концентрации токсиканта (табл.). Наблюдалось увеличение доли зелёных водорослей и уменьшение доли цианобактерий в опытах с внесением 300 и 750 мг/кг по сравнению с максимальной концентрацией свинца, что соответствует данным многих авторов об устойчивости одноклеточных зелёных водорослей к воздействию тяжёлых металлов [18, 29, 30]. Однако максимальная токсическая нагрузка угнетала жизнедеятельность этой группы, нарушала биохимические и физиологические процессы и приводила к исчезновению из состава сообщества. У каждого вида даже в пределах одного таксона существуют индивидуальные пределы токсикорезистентности. Так, в нашей работе устойчивыми к дозам свинца 300 и 750 мг/кг оказались виды зелёных водорослей *Chlamydomonas cf. reinhardtii* и *Chlorella vulgaris*, а цианобактерии *Nostoc muscorum*, *Cylindrospermum minutissimum* Collins, *Aphanothece saxicola* Negeli и зелёная водоросль *Bracteacoccus minor* (Chod) Petrova присутствовали при всех уровнях загрязнения и доминировали в АЦС. Чувствительная цианобактерия *Chroococcus minutus* (Kutzing) Negeli и зелёная водоросль *Characium sp.* встречались только в контроле и даже при минимальной токсической нагрузке исчезали из состава сообщества. Цианобактерия *Nostoc punctiforme* (Kutzing) Hariot присутствовала в составе сообщества при низкой концентрации свинца, однако при увеличении концентрации металла носток обнаружен не был. Виды цианобактерий *Anabaena cylindrica* Lemmermann

и *Plectonema gracillimum* Zopf ex Hansgirg, а также водоросли *Tetracystis excentrica* R.M. Brown & Bold и *Vaucheria sp.*, относящиеся к отделам Chlorophyta и Xanthophyta соответственно, не проявили чёткой реакции на загрязнение.

Заключение

Показано, что адаптация АЦС к воздействию свинца достигалась за счёт увеличения размеров слизистых чехлов, которые служат сорбционными барьерами для тяжёлых металлов, торможения жизненной активности и перехода водорослей и цианобактерий в состояние покоя в стрессовых условиях. Адаптационная стратегия к токсической нагрузке на уровне сообщества основывалась на структурно-видовых изменениях АЦС: при увеличении концентрации свинца в составе сообщества сохранялись только устойчивые виды цианобактерий *Nostoc muscorum*, *Cylindrospermum minutissimum*, *Aphanothece saxicola*, а также зелёная водоросль *Bracteacoccus minor*. В целом сохранность сообщества при загрязнении почв свинцом достигалась с помощью комплекса одновременно действующих и взаимодополняющих друг друга адаптационных механизмов на разных уровнях биологической организации.

Кроме того, важным вопросом является выбор формы химического соединения металла. При внесении свинца в почву в форме легкорастворимой соли, такой, как $Pb(CH_3COO)_2$, металл является наиболее мобильным и равномерно распределяется в почве, что позволяет более точно оценить его токсическое действие. Однако в экотоксикологических экспериментах следует также учитывать сопутствующий анион, способный оказывать собственное влияние на АЦС и свойства почвы. В нашей работе установлено, что ацетат-анион стимулирует развитие АЦС и при внесении низкой дозы ацетата свинца нивелирует токсический эффект катиона.

Литература

1. Николаев Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 387–397.
2. Кузяхметов Г.Г., Дубовик И.В. Методы изучения почвенных водорослей: Учебное пособие. Уфа: Изд-во Башкирск. ун-та, 2001. 60 с.

3. Хазиев Ф.Х., Кабиров Р.Р. Количественные методы почвенно-альгологических исследований. Уфа: Изд-во БФАН СССР, 1986. 172 с.
4. Королев В.А. Очистка грунтов от загрязнений. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 365 с.
5. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли (*Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales*). СПб.: Наука, 1998. 351 с.
6. Васильева И.И. Эвгленовые и жёлто-зелёные водоросли Якутии. Л.: Наука, 1987. 366 с.
7. Голлербах М. М., Косинская Е. К., Полянский В. И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. Синие-зелёные водоросли. М.: Советская наука, 1953. 651 с.
8. Дедусенко-Щеголева Н.Т., Голлербах М.М. Определитель пресноводных водорослей СССР. М.: Изд-во АН СССР, 1962. Вып. 5. Жёлто-зелёные водоросли. 273 с.
9. Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. Киев: Наукова думка, 1990. 208 с.
10. Komarek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota* – 1. Teil: *Chroococcales* // *Sußwasserflora von Mitteleuropa*, Band 19/1 / Eds. H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig, D. Mollenhauer Gustav Fischer Verlag. 1998. 548 p.
11. Komarek J., Fott V. *Chlorophyceae* (Grünalgen). Ordnung *Chlorococcales* // *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. Teil 7, Hälfte 1*. Stuttgart: Schweizerbart, 1983. 1044 S.
12. Гецен М.В., Стенина А.С., Патова Е.Н. Альгофлора Большеземельской тундры в условиях антропогенного воздействия. Екатеринбург: Наука, 1994. 148 с.
13. De Philippis R., Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible application // *FEMS Microbiology Reviews*. 1998. V. 22. № 3. P. 151–175.
14. Шнюкова Е.И. Аккумуляция ионов металлов экзополисахаридами *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flach. (*Cyanophyta*) // *Альгология*. 2005. Т. 15. № 2. С. 172–180.
15. Шнюкова Е.И. Экзопалисахариды *Nostoc Vauch.* ex Born. et Flah. (*Cyanophyta*) и их сорбирующая функция // Актуальные проблемы современной альгологии: Тез. докл. III Междунар. конф. Харьков. 2005. С. 186–187.
16. Bender J., Rodriguez-Eatot S., Ekanemesang U.M., Phillips P. Characterization of metal-binding biofloculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats // *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. V. 60. № 7. P. 2311–2315.
17. Кабиров Р.Р. Альгоиндикация с использованием почвенных водорослей (методические аспекты) // *Альгология*. 1993. Т. 3. № 3. С. 73–83.
18. Кузяхметов Г.Г. Альгологическая оценка токсичности препаратов меди в серой лесной почве и чернозёме выщелоченном // *Почвоведение*. 1998. № 8. С. 968–973.
19. Ochiai E.I. Toxicity of heavy metals and biological defense: principles and application in bioinorganic chemistry // *Journal of Chemical Education*. 1995. V. 72. № 6. P. 479–484.
20. Stons S.J., Badchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // *Free Radical Biology & Medicine*. 1995. V. 18. № 2. P. 321–336.
21. Bender J., Lee R.F., Phillips P. Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in bioremediation // *Journal of Industrial Microbiology*. 1995. № 14. P. 113–118.
22. Москвина М.И., Бреховских А.А., Бекасова О.Д., Никандров В.В. Роль слизистой оболочки цианобактерии *Nostoc muscorum* в связывании и детоксикации ионов кадмия // *Автотрофные микроорганизмы: Тез. докл. Междунар. науч. конф. М. 2000. С. 124–125.*
23. Костяев В.Я. Синезелёные водоросли и эволюция эукариотных организмов. М.: Наука, 2001. 126 с.
24. Mochapatra P.K., Mochanty R.C., Sinha M. Effect of organic carbon sources of the toxicity of mercury to *Chlorococum infusorium* (Schranc) Meheng and *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs // *Acta Hydrobiologica*. 1995. V. 37. № 1. P. 21–28.
25. Гапочка Л.Д., Шавырина О.Б. Популяционные аспекты устойчивости микроводорослей к токсическим воздействиям // *Альгология*. 1999. Т. 9. № 2. С. 31.
26. Фокина А.И. Влияние свинца на структуру фототрофных микробных комплексов почвы: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Сыктывкар: ИБ Коми НЦ УрО РАН, 2008. 25 с.
27. Феофилова Е. П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2003. Т. 39. № 1. С. 5–24.
28. Ильичев В.Г., Авраменко Л.Г. Механизмы адаптации водорослей. Модели и приложение // *Журнал общей биологии*. 1994. Т. 55. № 3. С. 356–366.
28. 29. Евдокимова Г.А., Мозгова Н.П., Штина Э.А. Загрязнение почв фтором и оценка состояния микробного компонента в зоне действия алюминиевого завода // *Почвоведение*. 1997. № 7. С. 898–905.
30. Nalewaiko C., Olaveson M. M. Differential responses of growth, photosynthesis, respiration phosphate uptake to copper in copper-tolerant and copper-in-tolerant strains of *Scenedesmus aquatus* (*Chlorophyceae*) // *Canadian Journal of Botany*. 1995. V. 73. № 8. P. 1295–1303.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Патовой Е.Н. и к.б.н. Новаковской И.В. за помощь в видовом определении цианобактерий и водорослей.

Исследования выполнены при поддержке проекта Министерства образования и науки РФ № 2.1.1/3819 и гранта РФФИ №09-04-00652.