

Комплексная оценка состояния цианобактерии *Nostoc paludosum* Kütz. при воздействии различных поллютантов

© 2010. С. Ю. Огородникова¹, к.б.н., с.н.с, Ю. Н. Зыкова², аспирант,
Г. И. Березин³, аспирант, Л. И. Домрачева^{1,2}, д.б.н., профессор,
А. А. Калинин², к.б.н., доцент,
¹Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
²Вятская государственная сельскохозяйственная академия,
³Вятский государственный гуманитарный университет,
e-mail: ecolab2@gmail.com

В качестве маркерных признаков при изучении состояния популяции цианобактерии *Nostoc paludosum* под воздействием различных поллютантов были выбраны следующие показатели: титр клеток, их жизнеспособность, перекисное окисление липидов и активность каталазы. Доказана тесная коррелятивная зависимость между интенсивностью перекисного окисления липидов и количеством мёртвых клеток, а также между активностью каталазы и количеством живых клеток в популяции *Nostoc paludosum*. Было показано, что наиболее надёжным критерием состояния популяции можно считать жизнеспособность клеток.

Investigating the state of the population of the cyanobacterium *Nostoc paludosum* under the influence of different pollutants the following features were chosen as markers: cell titer, their life energy, lipid peroxidation and catalase activity. It was proved that there is a close connection between the intensiveness of lipid peroxidation and the amount of dead cells, as well as between catalase activity and the number of cells alive in the population of *Nostoc paludosum*. It was stated that the most reliable criterion of the population state is the life energy of cells.

Ключевые слова: цианобактерии, жизнеспособность клеток, токсиканты, состояние популяции, перекисное окисление липидов, каталаза

Key words: cyanobacteria, life energy of cells, toxicants, the state of the population, lipid peroxidation, catalase

Разработка микробных тест-систем в условиях продолжающегося загрязнения окружающей среды имеет большое значение. Важно выявить такие показатели состояния микробных популяций, которые бы адекватно отражали степень токсического действия поллютантов. В этом плане большой интерес представляют широко распространённые в природе виды уникальных прокариотных фототрофов – цианобактерий (ЦБ). Многочисленными исследованиями доказано, что ЦБ потенциально обладают большими адаптационными, биоремедиационными, антагонистическими способностями [1 – 6]. При этом эффект воздействия во многом определяется плотностью клеток в популяции ЦБ [7].

Целью данной работы было изучение влияния различных поллютантов на такие показатели состояния популяции *Nostoc paludosum*, как плотность клеток, их жизнеспособность, перекисное окисление липидов и активность каталазы.

Объекты и методы

Объектом исследования была почвенная ЦБ *Nostoc paludosum* Kütz. № 18 из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры ботаники, физиологии растений и микробиологии им. Э.А. Штиной Вятской ГСХА. Данный штамм изолирован из дерново-подзолистой почвы на территории Кировской области. *Nostoc paludosum* является одним из наиболее распространённых видов азотфиксирующих ЦБ в почвах природных и антропогенных экосистем. Он может в массе размножаться на поверхности почвы, вызывая её «цветение», легко культивируется, обладает высокой скоростью роста. Для данного штамма доказана способность восстанавливать супрессивность химически и микологически загрязнённых почв [4, 7].

В качестве токсикантов выбраны соединения, являющиеся загрязнителями в городских и сельскохозяйственных экосистемах: тяжёлые металлы (ТМ) свинец и медь, хлорид натрия, бензин и гербицид трефлан,

в концентрациях, реально присутствующих в окружающей среде.

Свинец испытывали в виде ацетата, медь – в виде сульфата. Бензин 92-й марки компании «Лукойл» отобран на одной из заправок г. Кирова. Трефлан – селективный довсходовый гербицид длительного действия для уничтожения однолетних сорняков в посевах многолетних сельскохозяйственных культур. Действующее вещество: трифлуралин (2, 6 – динитро 4-трифторметил-N, N-дипропилин). Его выбор обусловлен широким использованием в сельском хозяйстве для борьбы с однодольными сорными растениями и длительной устойчивостью продуктов разложения в почве. Установлено, что при фотохимическом разложении трефлана образуются алкил- и диалкилбензимидазолы и азоксианилины и ряд других веществ. Производные бензимидазола достаточно стабильны и могут сохраняться в объектах окружающей среды достаточно длительное время.

Концентрации поллютантов для ТМ соответствовали 5 ПДК, для бензина и хлорида натрия – 5% от объёма культуральной среды, для трефлана была выбрана производственная доза – 0,2%.

Культуру *N. paludosum* в течение 8 недель выращивали в жидкой среде Громова № 6 без азота. За этот период развитие ЦБ достигает пика экспоненциальной фазы, и культура находится в наиболее активном состоянии. Затем в накопительную культуру ностока вносили испытуемые поллютанты и оставляли на 7 суток. По истечении указанного периода отбирали пробы на проведение необходимых анализов. Плотность популяции определяли по титру клеток с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность клеток определяли по активности дегидрогеназы тетразольно-топографическим методом [7]. Для этого гомогенизированную культуру ЦБ после отмывания водой выдерживали в 0,075% растворе трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) 3 часа. После повторного отмывания водой готовили мазки и просчитывали под иммерсионным микроскопом количество живых (с красными кристаллами формазана) и мёртвых (без кристаллов) клеток (по 500 клеток на каждом из 9 мазков).

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в культуре *N. paludosum* анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ. За основу была взята методика определения ПОЛ в растительных тканях [8] в нашей модификации.

Для анализа отбирали 1 мл гомогенизированной культуры ЦБ, добавляли ТРИС-НСI буфер (рН 7,6) и 0,5% раствор тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте. Полученный раствор кипятили на водяной бане в течение 30 минут. Оптическую плотность фильтрата определяли на спектрофотометре Specol-1100 при длине волны 532 нм.

Активность каталазы определяли газометрическим методом [9] в нашей модификации, разработанной для ЦБ.

Результаты и обсуждение

Наблюдения показали, что изменения в состоянии популяций ЦБ при внесении токсикантов отмечаются уже на визуальном уровне. В контрольном варианте мощное развитие цианобактериальных плёнок с бурным выделением пузырьков газа отмечается по всему объёму колбы с максимумом развития на поверхности. Внесение ацетата свинца приводит к существенному осажению биоплёнок на дно. В колбах с внесением соли меди наблюдалось осажение культуры ЦБ на дно в виде голубоватых хлопьев. Внесение хлорида натрия приводит к интенсивному окрашиванию культуральной жидкости в ярко-малиновый цвет. Добавление трефлана и бензина также вызывают изменение окраски культуральной жидкости в желтовато-розовый цвет. Изменение окраски явно свидетельствует о разрушении клеток с выделением в окружающую среду фотосинтетических пигментов.

Определение титра клеток показало, что плотность популяций во всех вариантах достаточно велика и колеблется в незначительных пределах (табл. 1).

При анализе результатов видно, что только внесение сульфата свинца и трефлана ведёт к снижению численности клеток по сравнению с контролем примерно вдвое. Действие соли меди, хлорида натрия и бензина приводит к снижению плотности клеток на 28,5–36,5% (табл. 1).

При подсчёте численности клеток в камере Горяева было отмечено, что наиболее сильные морфологические нарушения зафиксированы в варианте с бензином, где практически не сохранились нити ЦБ, а культура была представлена в виде отдельных клеток. Укорачивание и фрагментация нитей наблюдались в вариантах с ацетатом свинца, хлоридом натрия и трефланом. В варианте с внесением соли меди структура нитей, форма клеток оставались практически на том же уровне, что в

Таблица 1

Влияние токсикантов на плотность популяции *Nostoc paludosum*

Вариант	Титр, клеток/мл·10 ⁷	Снижение титра, % к контролю
1. Контроль	3,40±0,27	
2. Ацетат свинца	1,79±0,12	52,6
3. Сульфат меди	2,16±0,21	63,5
4. Хлорид натрия	2,43±0,11	71,5
5. Трефлан	1,60±0,15	47,0
6. Бензин	2,30±0,21	67,6

Таблица 2

Изменение соотношения живых и мёртвых клеток в популяции *Nostoc paludosum* под влиянием токсикантов

Вариант	Количество клеток, %	
	живых	мёртвых
1. Контроль	99,06±0,32	0,94
2. Ацетат свинца	85,13±3,77	14,87
3. Сульфат меди	0	100
4. Хлорид натрия	21,7±0,48	78,29
5. Трефлан	8,77±0,85	91,23
6. Бензин	0	100

контроле и соответствовали диагностике вида. Однако окраска клеток с интенсивной синезелёной сменилась на бледно-малахитовую.

Определение жизнеспособности клеток по ТТХ показало существенное различие в соотношении живых и мёртвых клеток в популяции ностока в разных вариантах (табл. 2).

Как видно из табл. 2, жизнеспособность *Nostoc paludosum*, развивающегося в контрольном варианте (среда Громова), чрезвычайно велика: 99% клеток проявляют дегидрогеназную активность. Любые вносимые токсиканты снижают жизнеспособность клеток. В меньшей степени это проявляется при действии соли свинца, когда погибает около 15% клеток. Хлорид натрия приводит к гибели около 80% клеток. Более 90% клеток ностока гибнет под влиянием трефлана. Полная гибель популяции регистрируется при действии сульфата меди и бензина, хотя в этих вариантах сохраняются морфологические

структуры клеток (бензин) и нитей (медь), что позволяет определить их титр. Сопоставление результатов определения плотности клеток в культуре (камера Горяева) и их жизнеспособности (проба с ТТХ) заставляют внести коррективы в результаты, отражённые в таблице 1. Пересчёт титра клеток с учётом их жизнеспособности (табл. 3) показывает, что, во-первых, действие токсикантов намного сильнее, чем это проявляется при количественном учёте клеток, и, во-вторых, при определении токсичности различных соединений для *Nostoc paludosum* тест с определением титра клеток непригоден.

Определение жизнеспособности клеток (табл. 2) показывает, что степень токсичности испытуемых соединений имеет следующий вид: Cu=бензин>трефлан> NaCl> Pb.

Физиологическое состояние клеток и пост-мортальную активность ферментных систем можно определить, используя показатели

Таблица 3

Влияние различных токсикантов на содержание живых клеток в культуре *Nostoc paludosum*

Вариант	Численность живых клеток в 1 мл, ·10 ⁷	Снижение по отношению к контролю, %
1. Контроль	3,37	
2. Ацетат свинца	1,52	54,9
3. Сульфат меди	0	100
4. Хлорид натрия	0,53	84,3
5. Трефлан	0,14	95,8
6. Бензин	0	100

интенсивности процессов ПОЛ и активность каталазы.

Установлено, что внесение поллютантов в культуру *Nostoc paludosum* приводит к возрастанию интенсивности процессов перекисного окисления липидов (рис. 1). В большей степени отмечали увеличение уровня МДА в вариантах с солью меди и трефланом – в 5,9 и 3,6 раза соответственно. В вариантах с другими поллютантами накопление МДА было выше, чем в контроле, в 1,9 раза. Значительное накопление в культуре *Nostoc paludosum* МДА свидетельствует о том, что поллютанты инициируют процессы перекисного окисления липидов, вызывают повреждение клеточных мембран и нарушение функционирования кле-

ток. Данные по интенсивности процессов ПОЛ коррелируют ($r=0,61$) с результатами по оценке жизнеспособности клеток методами ТТХ. Так, в вариантах с сульфатом меди и трефланом установлено значительное накопление МДА и максимальное количество мёртвых клеток ЦБ. В варианте с бензином также все клетки ЦБ были нежизнеспособны, но уровень ПОЛ был ниже, чем в вариантах с солью меди, медью и трефланом. По-видимому, это связано с особенностями биотрансформации бензина, которая в основном идёт по пути окислительной деструкции с поглощением активного кислорода.

Изучение активности каталазы показало, что максимальная величина этого показателя

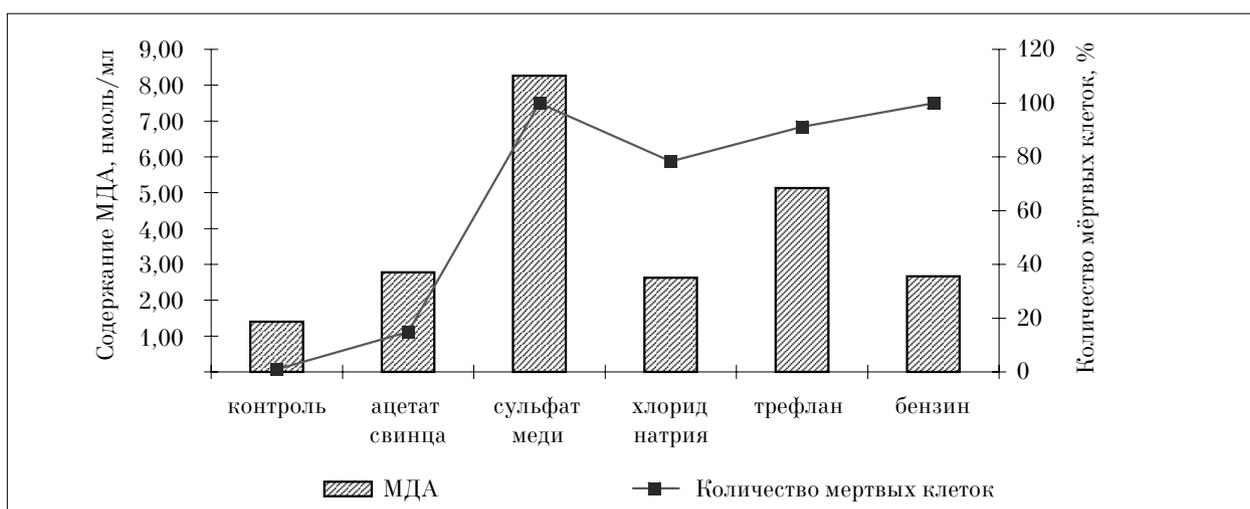


Рис. 1. Влияние токсикантов на интенсивность процессов ПОЛ и жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum*

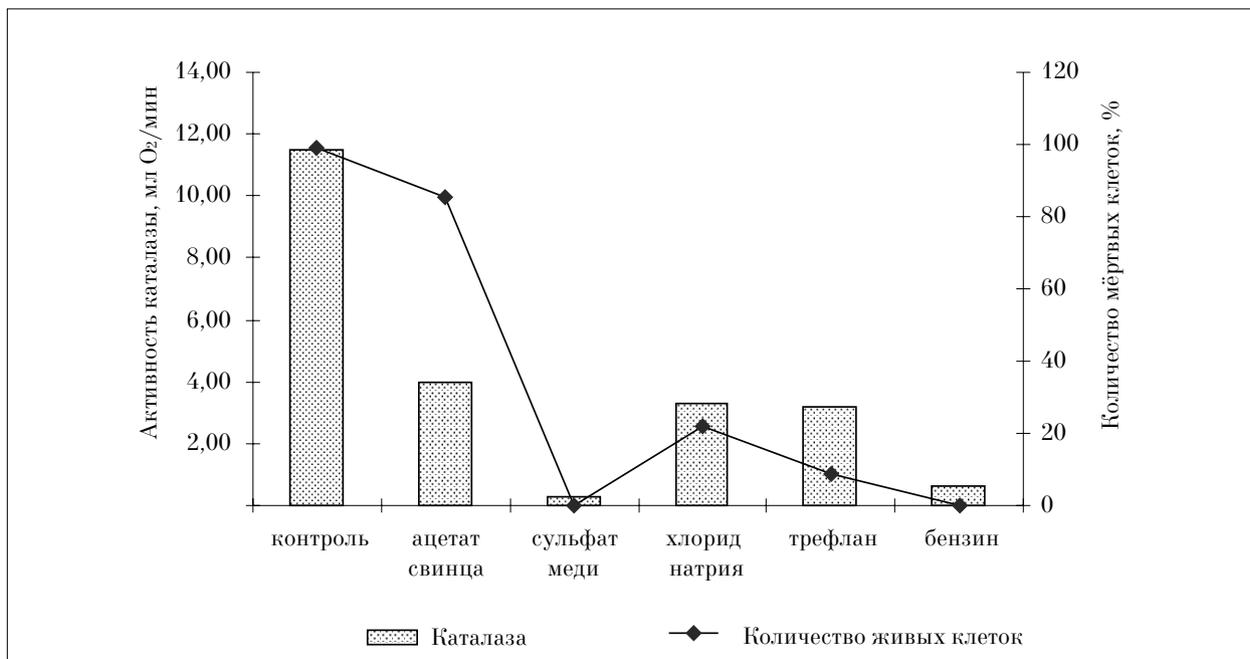


Рис. 2. Влияние токсикантов на активность каталазы и жизнеспособность клеток *Nostoc paludosum*

Таблица 4

Изменение каталазной активности культуры *Nostoc paludosum* под влиянием токсикантов

Вариант	Активность каталазы, мл O ₂ /мин
1. Контроль	11,5±1,32
2. Ацетат свинца	4,0±0,25
3. Сульфат меди	0,3±0,02
4. Хлорид натрия	3,3±0,43
5. Трефлан	3,2±0,37
6. Бензин	0,6±0,05

выявлена в контрольном варианте, а минимальные значения – в вариантах с внесением сульфата меди и бензина (рис. 2). Активность каталазы в культуре с внесением поллютантов имела тесную корреляцию с количеством живых клеток ($r=0,84$).

Таким образом, ряд токсичности соединений, выявленный по каталазе, имеет почти такой же вид, как и по жизнеспособности клеток: $Cu > \text{бензин} > \text{трефлан} = NaCl > Pb$.

Результаты определения каталазной активности показывают, что даже после полной гибели клеток (варианты с сульфатом меди и бензином) сохраняются и проявляют активность ферментные системы, вероятно, во внеклеточной среде.

Выводы

1. Доказана невозможность использования количественного учёта численности клеток *Nostoc paludosum* для определения степени токсичности различных поллютантов.

2. Показано, что при сохранении морфологической структуры клеток и нитей ЦБ при действии токсикантов может происходить их полная гибель.

3. Доказана тесная коррелятивная зависимость между интенсивностью ПОЛ и количеством мёртвых клеток, а также между активностью каталазы и количеством живых клеток в популяции *Nostoc paludosum*.

4. Можно использовать данные показатели (ПОЛ, каталазную активность и жизнеспособность клеток) в качестве биомаркеров стресса у *Nostoc paludosum* на поллютанты минеральной и органической природы.

5. Наиболее простым, доступным и экспрессным методом определения токсичности соединений для изучаемого штамма ЦБ является метод определения жизнеспособности клеток с помощью ТТХ.

Литература

1. Андреюк Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. Цианобактерии. Киев: Наукова думка, 1990. 200 с.
2. Гапочка Л.Д. Популяционные аспекты устойчивости цианобактерий и микроводорослей к токсическому фактору: Автореф. дис. ... докт. биол. наук в форме научного доклада. М. 1999. 64 с.
3. Шадрина О.И. Цианобактериальные сообщества в практике рекультивации техногенных экосистем // 8-й съезд Гидробиол. о-ва РАН. Т. 3. Калининград. 2001. С. 89–90.
4. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар. 2005. 330 с.
5. Сопрунова О.Б. Функционирование цианобактериальных сообществ в условиях техногенных экосистем // Вестн. МГУ. Сер. 16. 2006. № 2. С. 24–29.
6. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Попов Л.Б., Зыкова Ю.Н. Биоремедиационные возможности почвенных цианобактерий (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 1. С. 8–17.
7. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 2. С. 23–28.
8. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
9. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 1990. 189 с.