

Московский Государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Биологический факультет

На правах рукописи

МАРУШКИНА Екатерина Викторовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИИ
ВОДОРΟΣЛИ *Scenedesmus quadricauda*
В НОРМЕ И ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ МЕТОДОМ МИКРОКУЛЬТУР**

03.00.18 — Гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва—2005

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

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор О.Ф. Филенко

Научный консультант:

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

Официальные оппоненты:

д. б.н., профессор Васильева-Кралина Инна Ивановна

к.б.н. Горюнова Светлана Васильевна

Ведущее учреждение - Институт биологии внутренних вод

им. И.Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН)

Защита состоится 17 ноября 2005 г. в 15³⁰ часов на заседании специализированного
ученого совета Д 053.05.71 в Московском государственном университете им. М.В.
Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет, ауд 300

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического ф-та МГУ

Отзыв в двух экземплярах просим направлять по адресу:

119899, Москва, МГУ, Биологический ф-т, специализированный Ученый Совет
Д 053.05.71

Автореферат разослан 14 ^{ок} ноября 2005 г.

Ученый секретарь совета



Н.В. Карташева

2006-4
13383

2173750

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Одним из основных свойств любой, как природной, так и лабораторной популяции является ее гетерогенность. Особи, образующие популяцию, не тождественны, они отличаются по возрасту, размерам, скоростям роста и, что особенно важно, по реакциям на изменение условий обитания. Именно неоднородность качественного состава популяции обеспечивает ее устойчивость и адаптацию к внешним условиям (Строганов, 1973; Гапочка, 1981; Гродзинский, 1983)

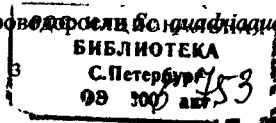
Широкие возможности для исследования гетерогенности популяций предоставляют лабораторные культуры микроводорослей. В настоящий момент установлена гетерогенность популяций лабораторных микроводорослей по таким показателям, как размеры клеток (Прохоцкая, 2002), их морфологические характеристики (Trainor 1964; Капков, 1972), фотосинтетическая активность (Погосян, 2003). Однако, оценка гетерогенности культуры по жизнестойкости и способности отдельных клеток к размножению затруднительна из-за технических сложностей. В литературе мы не нашли указаний о том, как отдельные клетки, составляющие популяцию, участвуют в ее развитии, и каким образом токсичные вещества влияют на активность деления и смертность клеток.

Поэтому целью настоящей работы являлась исследование, с применением специально разработанного метода, структурных перестроек модельной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. в норме и при токсическом воздействии.

В задачи работы входило:

1. Разработка метода раздельного культивирования ценобиев водоросли *Scenedesmus quadricauda* и наблюдение за микрокультурами;
2. Исследование гетерогенности лабораторной популяции водорослей по выживаемости и способности отдельных клеток к делению;
3. Исследование влияния токсического воздействия на выживаемость и размножение водорослей в лабораторных популяциях;
4. Определение времени лизиса отмирающих клеток водорослей и оценка влияния на скорость лизиса присутствия токсиканта.

Научная новизна. Разработан метод, впервые позволяющий вести длительное раздельное наблюдение за клетками микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*. С применением



нового метода впервые проведена прямая оценка смертности и активности размножения в культуре, времени лизиса погибших клеток. Установлено, что основную часть культуры составляют покоящиеся клетки, а рост численности обеспечивается небольшим количеством размножающихся клеток, доля которых изменяется в зависимости от фазы развития культуры. Впервые, на примере хлорида меди, показано, что тяжелые металлы в широком диапазоне концентраций снижают численность клеток в культурах за счет подавления размножения клеток, и лишь при высоких концентрациях вызывают повышение их смертность и существенно замедляют скорость лизиса погибших клеток.

Практическое значение работы. Впервые предложен метод, позволяющий количественно оценивать изменение смертности и активности размножения в культуре микроводорослей в исследовательской практике, при биотестировании качества водной среды и при эколого-рыбохозяйственном нормировании. Впервые показано, что при оценках состояния культур и популяций по показателям соотношения живых и мертвых клеток в процессе мониторинга существенное значение может иметь не только повышение смертности, но и замедление лизиса погибших клеток.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2004» (Москва, 2004); 8-ой молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2004); 2-ой международной научной конференции «Биотехнология - охране окружающей среды» (Москва, 2004); Международной научно-практической конференции «Человечество и окружающая среда» (Москва, 2004); 3-ей Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Харьков, 2005); 2-ой й международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 140-летию одесского национального университета им. И.И. Мечникова (Одесса, 2005).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий источники, и приложение. Работа иллюстрирована рисунками и таблицами.

Публикации. По теме диссертации опубликовано работ, находится в печати.

II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объектом исследования послужила альгологически чистая культура пресноводной хлоркокковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* Turp. (Breb.). Для опыта использовали нормально развивающуюся культуру водорослей, частично синхронизированную чередованием "дня" и "ночи" (Успенская, 1966). Водоросли выращивали на среде Успенского N1 в люминостате с интенсивностью света до 5 тыс. люкс при 12-часовом чередовании света и темноты и температурой 20-22 °С.

В качестве модельного токсиканта был использован хлорид меди в концентрациях 0,0001 мг/л; 0,001 мг/л; 0,01 мг/л; 0,1 и 1 мг/л в пересчете на медь. Токсикант добавлялся непосредственно в культуру на разных этапах ее выращивания: в период лаг-фазы (0 сутки), в период экспоненциальной фазы (14-15 сутки) и на стационарной фазе (29 сутки). В дальнейшем культура с внесенной медью также инкубировалась в течение до 31 суток параллельно с контрольной.

Общую численность клеток водоросли в культуре определяли методом прямого счета в камере Горяева в 25 больших квадратах при трехкратном ее заполнении. Общую численность клеток выражали в тыс.кл./мл и в процентах по отношению к контролю. Соотношение живых, мертвых и отмирающих клеток (в % от общей численности) определяли с помощью люминесцентной микроскопии (Горюнова, 1952; Дмитриева, 1988). Оценку состояния фотосинтетического аппарата одиночных клеток проводилась с помощью микрофлуорометрического метода по переменной флуоресценции хлорофилла на установке, разработанной и любезно предоставленной нам для работы д.б.н. Погосьяном С.И. (кафедра Биофизики Биофака МГУ). Определяли фоновую флуоресценцию (F_0), максимальную флуоресценцию (F_m) и относительную переменную флуоресценцию (F_v/F_m) ценобия.

Оценку гетерогенности популяции водоросли по способности клеток к выживанию и размножению проводили с помощью разработанного нами метода микрокультур, позволяющего контролировать состояние и развитие одиночных клеток.

Статистическую обработку полученных результатов производили в соответствии с "Методическим руководством по биотестированию воды" (РД 118-02-90, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. РАЗРАБОТКА МЕТОДА РАЗДЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЦЕНОБИЕВ ВОДОРОСЛИ *Scenedesmus quadricauda*.

Общая численность клеток водоросли в культуре, выращиваемой стандартным стационарным способом, в контроле изменялась в соответствии с классической логистической зависимостью с выраженным чередованием фаз.

Из исходной культуры, названной нами условно *макрокультурой*, на различных этапах ее развития случайным образом пипеткой отбирали по 12-24 живых (по показаниям люминесцентной микроскопии) ценобия. В контроле отбор производился каждые 3-4 суток, в опытах с токсикантом – на основных фазах ее развития. Отобранные ценобии рассаживали отдельно в камеры Горяева. Для выращивания клеток в камерах использовали отфильтрованную среду из макрокультуры. Наблюдение за каждым отдельным ценобием, выращиваемым в камере, проводили в течение 80 часов с ежедневным учетом численности и состояния клеток. Миниатюрные культуры, сформировавшиеся в камерах в результате деления клеток, мы условно называли *микрокультурами*.

В зависимости от процессов, протекающих в микрокультурах, клетки были условно разделены на отмирающие - погибавшие в процессе наблюдения; размножившиеся, которые дали потомство автоспор и покоящиеся, которые остались живыми в течение 80 часов, но не дали потомства.

Основным показателем состояния культуры служило процентное соотношение отмирающих, покоящихся и размножившихся клеток.

На основе данных, полученных при анализе микрокультур, рассчитывали удельную рождаемость ($n_{\text{род}}$) и удельную смертность ($n_{\text{смерт}}$). Удельная рождаемость представляет собой среднее количество вновь рожденных клеток в микрокультурах серии, отнесенное к сроку, за который размножение произошло:

$$n_{\text{род}} (\text{кл/сут}) = N_{\text{род}}^* / (N_{\text{исх}} * \Delta t);$$

где: $N'_{\text{род}}$ - общая численность клеток появившихся в микрокультуре; $N_{\text{исх}}$ - общая исходная численность клеток в микрокультуре, Δt - время наблюдения, в данном случае 3 суток.

Удельная смертность выражалась как отношение среднего числа погибших клеток в микрокультурах к сроку, на протяжении которого гибель учитывалась:

$$n_{\text{смерти}} (\text{кл/сут}) = N'_{\text{отм}} / (N_{\text{исх}} * \Delta t),$$

где: $N'_{\text{отм}}$ - общая численность клеток отмерших в за время Δt .

Вычисление среднего удельного прироста (n), представляющего собой прирост числа клеток на одну исходную клетку в сутки (кл/сут), проводили в соответствие с уравнением:

$$n = (N_{(t+\Delta t)} - N_t) / \Delta t * N_t,$$

где N_t и $N_{(t+\Delta t)}$ - число клеток в сроки t и $(t+\Delta t)$, соответственно.

Сопоставление средних удельных приростов в макрокультуре в разные сроки ее роста и в микрокультурах из ценобиев, отсаженных в эти сроки, показало, что удельный прирост числа клеток в обоих вариантах близок (коэффициент корреляции 0,96), и это может свидетельствовать о том, что развитие процессов в микрокультурах адекватно отражает изменения, происходящие в макрокультуре. (табл. 1).

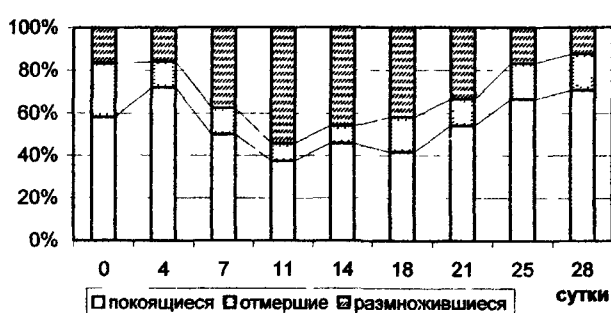
Поэтому мы сочли правоммерным результаты наблюдений за развитием микрокультур проецировать на процессы, происходящие в макрокультурах и использовать полученные результаты для характеристики популяции микроводоросли в целом.

Таблица 1. Сопоставление удельного прироста численности клеток микро- и макрокультурах (кл/сут)

Срок в сутках	Удельный прирост в микрокультуре	Удельный прирост в макрокультуре
0-3	-0,03	-0,06
4-7	0,06	0,06
7-10	0,13	0,10
11-14	0,33	0,30
14-17	0,21	0,16
18-21	0,14	0,09
21-24	0,17	0,08
25-28	0,04	0,04
28-31	0,07	0,01

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *SCENEDESMUS QUDRICAUDA* ПО ВЫЖИВАЕМОСТИ И СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК К ДЕЛЕНИЮ

Фракционный состав клеток, отобранных на разных этапах развития макрокультуры, существенно различался (рис.1).



В лаг-фазе, когда происходила адаптация к новым условиям, основную массу (60-70%) составляли покаящиеся клетки, доля размножающихся была всего 17 %. Доля отмирающих клеток была максимальной в самом начале наблюдения и уже на 3 - 4-е сутки понижалась до 12,5%. На этом

размн.	25±4	44±4	11±4
отм.	22±3	16±4	13±5
пок-ся	53±5	40±4	76±7

Рис.1. Изменение фракционного состава макрокультуры в процессе ее роста

этапе были низкими удельная рождаемость и удельный прирост численности клеток в микрокультуре (рис. 2). На 7 - 10 сутки доля покаящихся клеток снизилась до 40 - 50%, увеличилась доля размножающихся клеток, а доля отмирающих клеток не превышала 8 - 12%.

Возрастание доли клеток, способных давать потомство, существенно повлияло на уровень удельной рождаемости. Активность размножения была наибольшей на 11 - 14е сутки. но, поскольку общая численность в культуре в этот период была относительно невысокой, заметное увеличение общей численности клеток в макрокультуре произошло только на 17-20е сутки.

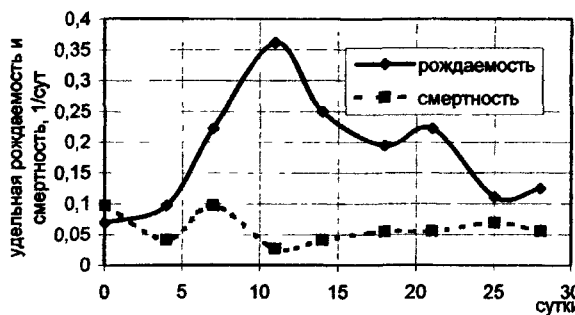


Рис.2. Динамика изменения удельной смертности и рождаемости клеток в микрокультурах, полученных на разные сроки роста макрокультуры.

В стационарной фазе возрастала доля покоящихся клеток и снижалась доля размножающихся. Удельная рождаемость и удельный прирост в микрокультурах снизились. Стабилизация общей численности клеток в макрокультуре произошла за счет увеличения доли покоящихся, а не погибающих клеток.

В целом в микрокультурах, отобранных на разные сроки, удельная рождаемость заметно превышала удельную смертность, достигая максимума на 11 сутки. Удельная смертность клеток, напротив, мало изменялась в ходе роста культуры. В результате изменение прироста общей численности клеток происходило главным образом за счет изменения рождаемости.

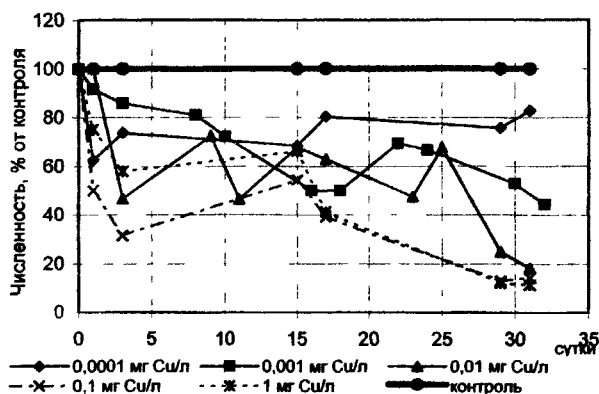
При выяснении возможной связи жизнеспособности клеток с их флуоресцентными характеристиками заметных различий флуоресцентных характеристик хлорофилла у клеток, относящихся к разным фракциям, обнаружено не было. Так средние значения F_v/F_m , определенные для каждой из групп, совпадали со средними значениями, полученными для данной фазы в целом. Вместе с тем, при анализе фракции отмирающих в стационарной фазе, было установлено, что, главным образом, отмечалась гибель ценобиов, либо с наименьшими, либо с наибольшими значениями относительной переменной флуоресценции. Вероятно, что как очень высокие, так и низкие значения относительной переменной флуоресценции являются аномальными для клетки и могут свидетельствовать о ее неблагоприятном состоянии. Для других фаз роста культуры такой зависимости отмечено не было.

При определении размеров клеток было установлено, что однозначной зависимости между размером клетки и ее принадлежностью к определенной фракции не существует. Как крупные, так и мелкие клетки могли участвовать в процессах размножения или оставаться в состоянии покоя. Исключение составили клетки с

шириной 3-4 мкм, которые не участвовали в размножении. По всей видимости, они представляли собой подрастающие молодые автоспоры. Общей тенденцией являлся несколько более крупный размер покоящихся клеток.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХЛОРИДА МЕДИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И РАЗМНОЖЕНИЕ ВОДОРΟΣЛИ *Sc quadricauda*.

3.1 Влияние внесения меди на лаг-фазе роста макрокультуры



Добавление меди в самом начале эксперимента приводило к значительным изменениям динамики общей численности клеток в культуре (рис.3).

Рис.3. Изменение общей численности клеток водоросли относительно контроля в макрокультуре при добавлении меди на лаг-фазе роста

В целом к концу наблюдения отмечена прямая концентрационная

зависимость, при которой с увеличением концентрации токсиканта угнетение усиливалось. Доля мертвых клеток по данным люминесцентной микроскопии также увеличивалась с возрастанием концентрации меди (табл. 2).

На рис.4 представлена динамика изменения фракционного состава макрокультуры при внесении меди на лаг-фазе, установленная методом микрокультур.

Таблица 2. Доля живых клеток в культуре *Sc. quadricauda* в % от общей численности (по данным люминесцентной микроскопии).

срок (сут.)	кон- троль	Концентрация меди (мгCu/л)				
		0,0001	0,001	0,01	0,1	1,0
3	99	98	98	95	85	60
11	94	98	88	-	-	80
17	94	90	90	90	80	70
24	96	94	94	-	-	40
31	94	92	94	92	90	35

При концентрациях 0,0001 и 0,001 мгCu/л общая динамика фракций клеток сохранялась такой же, как в контроле, однако была более низкой удельная рождаемость клеток. Смертность

была близкой к контролю. При 0,001 мгCu/л доля покоящихся клеток увеличилась. Сразу после внесения меди в концентрациях 0,01; 0,1 и 1,0 мгCu/л значения смертности в лаг-фазе были более высокими, чем в контроле. В дальнейшем, по мере адаптации культуры к новым условиям, смертность клеток снижалась до уровня, близкого к контролю. При концентрациях 0,01 и 1,0 мгCu/л удельная рождаемость клеток, как и в контроле, была заметно выше в фазе экспоненциального роста на 14 - 17 сутки, превышая значения этого показателя при концентрации 0,001 мгCu/л.

При концентрации 0,1 мгCu/л удельная рождаемость в микрокультурах в ходе всего опыта оставалась на уровне 0,06 кл/сут.

Доля покоящихся клеток при действии средних и больших концентраций меди, также как и в контроле, увеличивалась к стационарной фазе, однако, если при 0,1 мгCu/л этот показатель был в целом близок к контрольным значениям, то при 0,01 он был ниже, а при 1,0 мгCu/л в конце эксперимента даже несколько превышал значения в контроле.

Таким образом, хлорид меди при внесении его в самом начале эксперимента на лаг-фазе оказывал воздействие на численность клеток в культуре водоросли и на фракционный состав культуры. Начиная с концентрации 0,001 мгCu/л отмечено угнетающее воздействие меди на процессы размножения клеток.

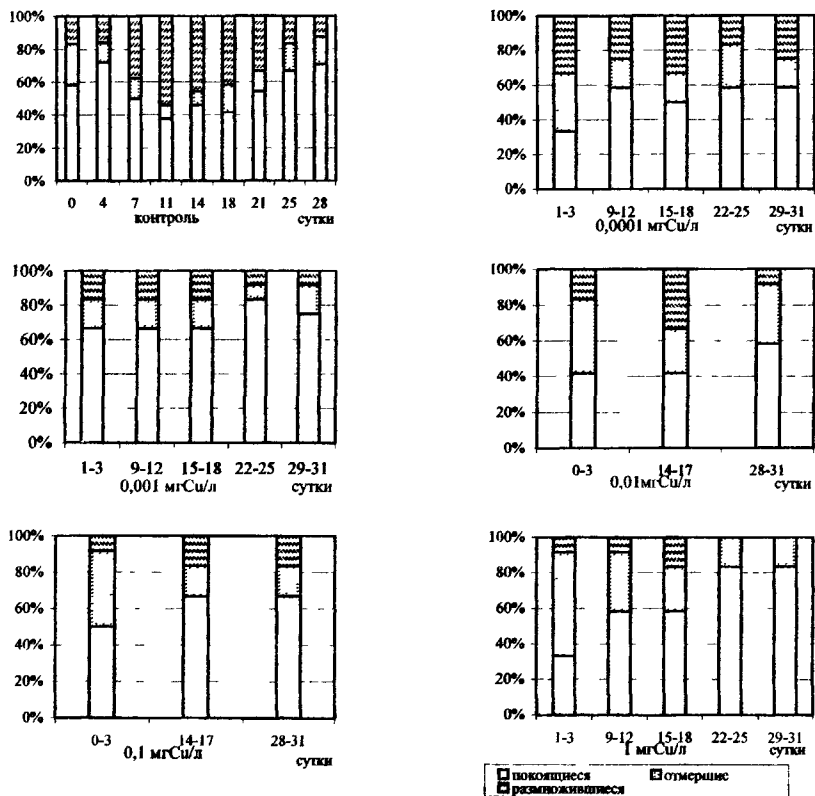


Рис. 4. Динамика изменения фракционного состава макрокультур после внесения меди на лаг-фазе роста, определявшаяся методом микрокультур

3.2 Влияние внесения меди на экспоненциальной фазе роста макрокультуры

При добавлении меди в культуру на экспоненциальной фазе (14 сутки) численность клеток при всех концентрациях оказалась ниже контрольных значений.

Степень угнетения культуры повышалась с возрастанием содержания меди в среде (рис. 5), однако при концентрации 0,1 мг Cu/л степень угнетения была сопоставима с концентрацией 0,0001 мгCu/л.

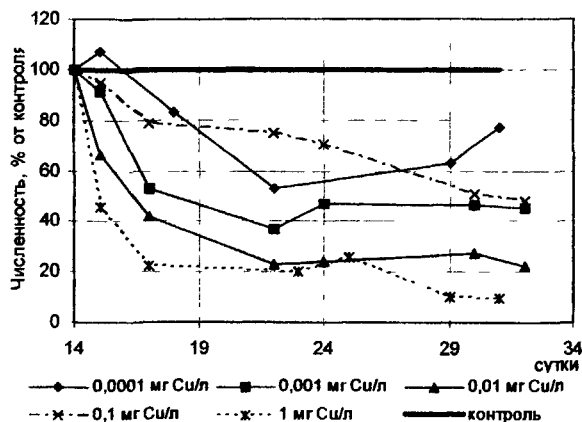


Рис.5. Изменение общей численности клеток водоросли в макрокультуре относительно контроля при добавлении меди на экспоненциальной фазе роста

погибали, либо переходили в покоящееся состояние. Доля отмирающих клеток с увеличением концентрации возрастала (рис. 6). Через две недели после начала эксперимента в культуре было отмечено восстановление процессов размножения при всех концентрациях, кроме самой большой (1,0 мг Cu/л).

При концентрации 0,0001 мгCu/л в этот период возрастала доля делящихся клеток, что свидетельствовало об активно идущих процессах восстановления культуры. При концентрациях 0,001; 0,01 и 0,1 мгCu/л через 14 дней доля размножающихся клеток не превышала 10%, и большая часть культуры находилась в покоящемся состоянии. В дальнейшем при концентрациях 0,00001 и 0,001 мгCu/л в культуре восстанавливались нормальные или несколько замедленные процессы ее роста. При 0,1 и 1,0 мгCu/л в культуре продолжалось отмирание клеток.

В целом влияние меди на фракционный состав микрокультур при внесении ее на экспоненциальной фазе роста проявлялось в большей степени, чем при внесении на лаг-фазе. Это может быть связано с тем, что на экспоненциальной фазе была значительная доля более чувствительных размножающихся клеток.

Добавление меди на экспоненциальной фазе, также как и на лаг-фазе существенно влияло на общую численность клеток и на фракционный состав культуры. В опытах с микрокультурами при всех концентрациях была отмечена полная остановка процессов размножения сразу после внесения токсиканта. Клетки либо

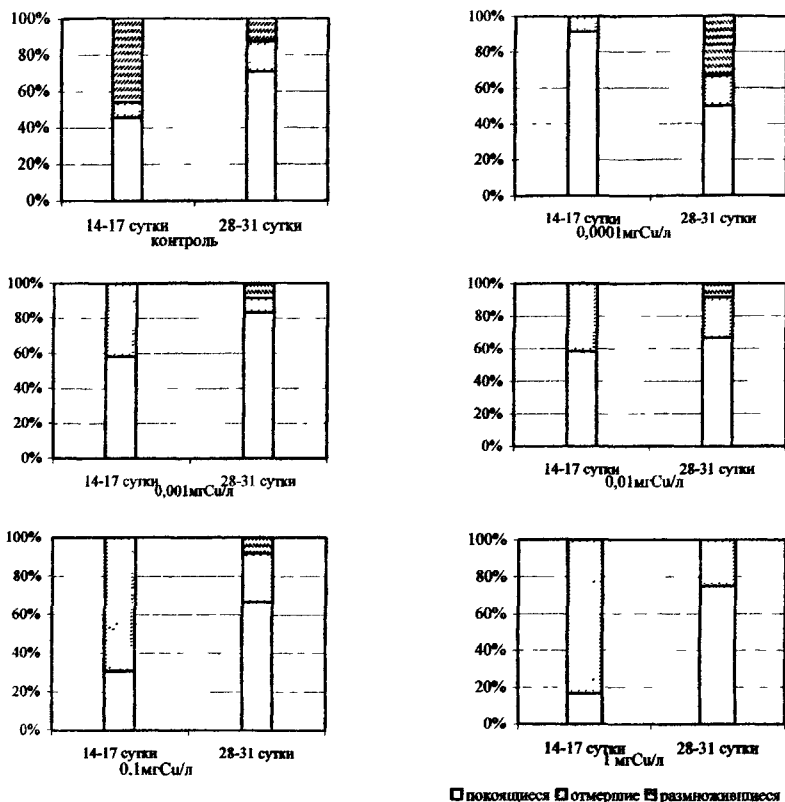


Рис 6. Динамика изменения фракционного состава макрокультур после внесения меди на экспоненциальной фазе роста, определявшаяся методом микрокультур

3.3 Влияние внесения меди на стационарной фазе роста макрокультуры

В макрокультуре в контроле на 29е сутки общая численность клеток изменялась мало, и большую часть популяции составляли покоящиеся клетки и внесение меди повлияло на общую численность клеток слабее, чем на лаг-фазе и экспоненциальной фазе.

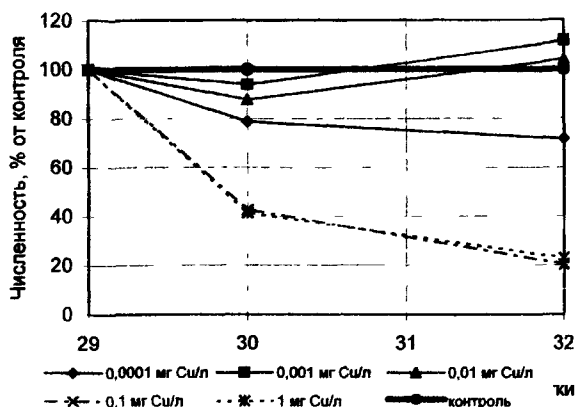


Рис.7. Изменение общей численности клеток водоросли в макрокультуре относительно контроля при добавлении меди на стационарной фазе роста

При концентрациях 0,001 и 0,01 мгCu/л численность оставалась на уровне контроля и даже отмечалась некоторая стимуляция роста культуры (рис. 7). При концентрациях 0,1 и 1,0 мгCu/л снижение общей численности культуры было меньше, чем при внесении меди на других фазах.

В изменениях фракционного состава наблюдалось три возможных схемы развития процесса. Первая имела место при больших концентрациях токсиканта (0,1 и 1,0 мгCu/л), когда происходила полная остановка процессов размножения на фоне высокой удельной смертности клеток. Это приводило к снижению общей численности клеток.

Вторая схема имела место при средних концентрациях (0,001 и 0,01 мгCu/л). Здесь происходило заметное увеличение, по сравнению с контролем, удельной рождаемости и смертности клеток, причем смертность была ниже рождаемости, что и послужило причиной некоторого прироста численности клеток в культуре. При концентрации 0,001 мгCu/л половина клеток в микрокультуре в течение 3-х суток приступала к размножению (рис. 8). Вероятно, в данном случае реализовался популяционный механизм компенсации влияния неблагоприятного фактора, когда на увеличение смертности популяция реагировала увеличением рождаемости.

Третья схема развития событий была отмечена при наименьшей из концентраций меди - 0,0001 мгCu/л. Фракционный состав культуры оказался близким к контролю и большую часть культуры составляли покоящиеся клетки. Несколько более низкой по сравнению с контролем была доля размножающихся клеток и, соответственно, удельная рождаемость. Можно предположить, что

незначительное возрастание смертности при этой концентрации привело к тому, что компенсаторные механизмы в культуре не отреагировали на слабое воздействие, и

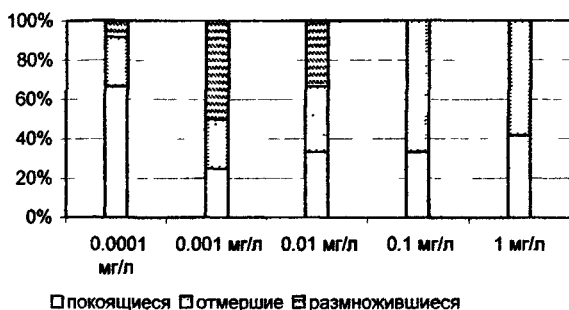


Рис. 8. Фракционный состав макрокультур после внесения меди на стационарной фазе роста, определявшийся методом микрокультуры.

стимуляции размножения не произошло. Большая часть клеток по-прежнему оставалась в состоянии покоя. Это повлекло за собой снижение прироста культуры и общей численности клеток по сравнению с контролем.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ ЛИЗИСА ОТМИРАЮЩИХ КЛЕТОК

Scenedesmus quadricauda И ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА СКОРОСТЬ ПРОЦЕССА ПРИСУТСТВИЯ ТОКСИКАНТА

Для определения продолжительности лизиса отмершие ценобии водоросли оставляли в камере Горяева, где за ними продолжалось наблюдение до окончания процессов разложения. Данные учитывали ежедневно. Было установлено, что для полного лизиса клеток в контроле требуется около 2-3 часов. При добавлении токсиканта время лизиса отмерших клеток увеличивалось. Если при концентрациях 0,0001 и 0,001 мгCu/л этот параметр, как и в контроле, было меньше 6 часов (табл. 3), то при концентрации меди 1 мгCu/л среднее время лизиса возрастало до 3-6 суток, т.е. процессы лизиса были сильно замедлены.

Причем клетки, погибшие в конце опыта, разрушались медленнее, чем в начале экспозиции. В результате замедление разрушения погибших клеток при повышенных концентрациях меди происходило накопление мертвых клеток в культуре.

Таблица 3. Длительность лизиса клеток, погибших при действии хлорида меди в различных концентрациях.

Срок развития макрокультуры,	Срок завершения лизиса погибших клеток, часы							
	18	24	30	66	90	102	126	>150
Контроль								
0-31 сутки								
0,0001 мгCu/л								
0-3 сутки	100							
8-31 сутки								
0,001 мгCu/л								
0-31 сутки								
1,0 мгCu/л								
0-3 сутки			43%				57	100
8-11 сутки				75%	100			
14-17 сутки		33%				66%		100
21-31 сутки								100

Таким образом высокая доля мертвых клеток в макрокультуре, определенная с помощью люминесцентных методов, может быть связана не только с возрастанием смертности клеток, но и с замедлением процессов их лизиса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Проведенные исследования продемонстрировали важную роль покоящихся клеток в жизни популяции *Sc.quadricauda*. Оказалось, что в разные моменты существования культуры их доля составляет от 40 до 80 %. Таким образом, рост и развитие культуры определяются относительно небольшим количеством клеток ответственных за размножение. В отличие от бактерий и синезеленых водорослей, где покоящиеся клетки являются особой устойчивой формой с пониженной физиологической активностью, которая обеспечивает выживание популяции при наступлении неблагоприятных условий, в покоящихся клетках *Sc. quadricauda* активно осуществляется фотосинтез.

По мере роста культуры и перехода ее на стационарную фазу доля покоящихся клеток в ней возрастает. При этом при пересадке ценобия в камеру количество среды и света, приходящееся на один ценобий, увеличивается, однако, это не приводит к усилению размножения. Это свидетельствует о том, что торможение процессов

деления клеток в этот момент связано не с автозатенением, а с какими-то метаболическими процессами в самих клетках или накоплением метаболитов в среде. Следует отметить, что в опытах с микроколониями хлореллы (Аникеева, Ваулина, Шевченко, 1964), где при переносе клеток на агар полностью снималось влияние накопленных в среде метаболитов, доля покоящихся клеток не превышала 5%. Это может являться косвенным свидетельством важной роли веществ, накапливаемых в среде, в переходе клеток к состоянию покоя.

Покоящиеся клетки не являются глубоко законсервированной системой. При слабых неблагоприятных воздействиях, когда возможность восстановления культуры зависит от скорости нарастания численности клеток в ней, они способны перейти к размножению. Примером такой ситуации может служить двукратное увеличение доли размножающихся клеток по сравнению с контролем на стационарной фазе при внесении средних концентраций хлорида меди (0,001 и 0,01 мг/л).

Метод микрокультуры позволил разделить и рассмотреть отдельно три процесса, которые определяют общую численность клеток в культуре в конкретный момент времени: размножение, отмирание и лизис отмерших клеток.

Оказалось, что в контроле смертность клеток остается примерно на одном невысоком уровне в ходе всего роста культуры. Это означает, что главным процессом, определяющим динамику развития популяции, является размножение, а изменение скорости прироста популяции связано с изменениями в процессах рождаемости. В стационарной фазе, когда рост культуры замедляется, происходит ослабление процессов размножения, а не увеличение гибели клеток.

В связи с тем, что угнетение культуры и более низкая численность клеток по сравнению с контролем может быть связана, как с усилением процесса гибели клеток, так и с подавлением размножения, возможность раздельного рассмотрения процессов размножения и отмирания клеток особо важна при оценках токсичности загрязняющих веществ.

Исследования показали, что первой реакцией культуры на токсикант является, обычно, снижение доли размножающихся клеток и их переход в покоящееся состояние. При увеличении уровня токсического воздействия повышается смертность клеток. В опытах с длительной экспозицией показано, что при восстановлении культуры в первую очередь также происходит снижение смертности клеток и лишь при низких концентрациях токсичных веществ идет некоторое

восстановление процессов размножения. Это свидетельствует о том, что размножение является процессом, наиболее чувствительным к неблагоприятным воздействиям. Вероятно, именно с этим связана более низкая устойчивость культуры в фазе экспоненциального роста, отмеченная в наших опытах, когда процесс размножения в момент внесения токсиканта шел наиболее активно.

При оценке смертности клеток в культуре встает вопрос о времени лизиса отмерших клеток, так как количество погибших клеток, оцениваемое с помощью люминесцентной микроскопии, зависит от того за какой период проходит их разрушение. При условии высокой скорости лизиса (порядка нескольких часов), которое наблюдается в контроле и при низких дозах хлорида меди, доля мертвых клеток остается на одном невысоком уровне. При замедлении лизиса в присутствии высоких доз хлорида меди (1 мгCu/л) количество погибших клеток в культуре постоянно возрастает, достигая к концу эксперимента 65% от общей численности клеток. При этом реальная смертность клеток в культуре не увеличивается, и к концу эксперимента соответствует контрольным значениям. Причиной замедления лизиса может быть как ингибирование процесса автолиза, так и угнетение активности сопутствующей микрофлоры, обеспечивающей утилизацию погибших клеток.

Таким образом, метод микрокультур позволил исследовать популяционные процессы, связанные с гибелью и размножением клеток в процессе роста культуры в норме и при воздействии хлорида меди.

ВЫВОДЫ.

1. Прием раздельного культивирования клеток водоросли *Scenedesmus quadricauda*, называемый нами методом микрокультур, позволил оценить жизнеспособность и активность клеток в макрокультуре водоросли. В частности, в культуре удалось определить относительное и абсолютное число размножающихся, покоящихся и погибающих клеток.

2. Основную часть культуры составляли клетки, находящиеся в покоящемся состоянии, особенно увеличивалась их численность в стационарной фазе роста культуры.

3. В контрольной культуре доля размножающихся клеток была сравнительно невелика, их абсолютное количество возрастало первые недели, достигая максимума к 18 суткам, с последующим снижением, в результате чего уровни размножающихся

и погибающих клеток становились близкими. Фракция погибающих клеток была меньше фракции размножающихся в период с 5 по 20 сутки. Изменение скорости прироста числа клеток в ходе развития культуры происходило за счет изменения показателей рождаемости на фоне относительно постоянной смертности.

4. Внесение меди на лаг – фазе и экспоненциальной фазе оказывало угнетающее воздействие на общую численность клеток, в целом усиливающееся с увеличением концентрацией токсиканта. При внесении меди на стационарной фазе роста эффект угнетения отмечался при концентрациях меди 0,1 и 1,0 мгCu/л. При средних концентрациях- 0,001 и 0,01 мгCu/л, напротив, происходила стимуляция процессов размножения, так что снижения общей численности клеток в культуре не происходило.

5. Наиболее сильное влияние на фракционный состав культур медь оказывала при внесении ее на экспоненциальной фазе, когда в популяции был велик процент более чувствительных размножающихся клеток. В начале эксперимента при всех концентрациях здесь происходила полная остановка процессов размножения и некоторое усиление процессов отмирания и только через 2 недели было отмечено некоторое восстановление культуры.

6. При внесении меди на лаг-фазе и фазе стационарного роста хлорид меди главным образом оказывал угнетающее воздействие на процессы размножения клеток, а начиная с концентрации 0,001 мгCu/л происходило еще и увеличение смертности клеток.

7. Время лизиса клеток в контроле оказалось малым по сравнению с длительностью жизненного цикла клеток (2-3 часа), а при добавлении меди в концентрации 1,0 мгCu/л возрастало до 3-6 суток. Таким образом, высокие концентрации токсиканта вызывали накопление мертвых клеток в культуре, а высокая доля мертвых клеток в макрокультуре, определенная с помощью люминесцентных методов, была связана не только с возрастанием смертности клеток, но и с замедлением процессов их лизиса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Марушкина Е.В. Определение активности процессов деления и отмирания клеток водоросли *Scenedesmus quadricauda* методом микрокультуры (2004) //Тезисы

- докладов 11 международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2004» (12-15 апреля 2004 г.), С. 103-104.
2. Марушкина Е.В. Использование микрокультур водорослей для выявления структуры популяций (2004)// Материалы 8 молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (7-21 мая 2004 года), С. 94-95.
 3. Марушкина Е.В. Особенности выращивания водоросли *Scenedesmus quadricauda* в условиях микрокультуры (2004)//Тезисы докладов 2 международной научной конференции «Биотехнология-охране окружающей среды» (25-27 мая 2004 г.), С. 54.
 4. Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Исследование структуры модельной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* методом раздельного культивирования клеток (2004)//Сборник материалов международной научно-практической конференции «Человечество и окружающая среда» 26-28 октября 2004 Москва, МГУ, С.190-195.
 5. Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В., Филенко О.Ф. Новый метод исследования модельных популяций одноклеточных микроводорослей (2005)//Материалы 3 Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Харьков, 20-23 апреля 2005). С.48-49.
 6. Марушкина Е.В., Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г. Новый подход к изучению структуры популяции микроводоросли (2005)// Материалы второй международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 140-летию одесского национального университета им. И.И. Мечникова (г.Одесса, 28 марта-1 апреля 2005), С.45.
 7. Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Использование метода микрокультур для оценки состояния популяции микроводоросли//Материалы IV Международной научной конференции «Фальцфейновские чтения» (г.Херсон, 18-20 мая 2005), т.2, с.43-46.
 8. О. Ф. Филенко, А.Г. Дмитриева, Е. В. Марушкина. Исследование структуры лабораторной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* Turp. (Breb) методом микрокультур. 2005. "Гидробиологический журнал" (в печати).
 9. О. Ф. Филенко, А.Г. Дмитриева, Е. В. Марушкина. Оценка эффекта меди на модельную популяцию водоросли *Scenedesmus quadricauda* Turp. (Breb) методом микрокультур. 2005. " Гидробиологический журнал " (в печати).

Подписано в печать 11.10.2005
Формат 60×88 1/16. Объем 1.0 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 121
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102

№ 18802

РНБ Русский фонд

2006-4

13383