

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 502:574.522

**ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОСТЕЙШИХ:
МЕСТО В ИЕРАРХИИ КРИТЕРИЕВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ****Е.И. Сарapultцева¹, Н.А. Тушмалова***(кафедра высшей нервной деятельности, лаборатория эволюции механизмов памяти;
e-mail: selenai@iate.obninsk.ru)*

Показано устойчивое не зависящее от дозы снижение двигательной активности инфузорий *Spirostomum ambiguum* сразу после γ -облучения в широком диапазоне доз. Негативный эффект наблюдается уже при дозе 0,01 Гр и наследуется в нескольких поколениях спиро-стом. Снижение двигательной активности сопровождается морфологической патологией, проявление которой также не зависит от дозы в широком диапазоне малых для объекта доз. Обсуждается возможность применения экспресс-метода оценки изменения двигательной активности простейших в биотестировании радиоактивного загрязнения среды и прогностический характер такого исследования.

Ключевые слова: *двигательная активность, простейшие, малые дозы радиации, экспресс-метод биотестирования, радиоактивное загрязнение окружающей среды.*

Вопросом о роли поведения в иерархии индикаторных показателей состояния окружающей среды занимались такие известные ученые, как Н.С. Строганов, А.Д. Слоним, Б.А. Флеров. В своих работах они показали, что степень отклонения от стандартных поведенческих реакций животных может служить одним из первичных, на визуальном уровне регистрируемых сигналов изменений в окружающей среде. Основателем экологической физиологии А.Д. Слонимом [1] указаны биологически значимые функции поведения беспозвоночных и позвоночных животных. В 1936 г. А.Д. Слоним писал: “Установление пластичности поведения в той же мере, что и пластичности регуляций физиологических функций, наряду с определением так называемых предельно допустимых концентраций загрязняющих и токсичных веществ и является той научной основой мероприятий по охране природы, которая должна объединить усилия как экологов, так и физиологов”. В современных природоохранных и экотоксикологических исследованиях изменения в поведении животных по-прежнему привлекают внимание широкого круга специалистов, занимающихся наблюдением, оценкой и прогнозированием состояния экосистем в условиях постоянно возрастающего антропогенного воздействия. Следует подчеркнуть, что подавляющее число работ выполнено на позвоночных животных. Использование поведения беспозвоночных в качестве критерия оценки факто-

ров среды — явление более редкое. Вопрос об индикаторной значимости форм поведения донервных (простейших) гидробионтов остается практически не разработанным.

Представленный в статье экологический аспект изучения врожденного поведения простейших гидробионтов позволяет, ссылаясь на найденные физиологами корреляции [2, 3] и благодаря эволюционным закономерностям изменений в поведенческих феноменах одного вида животных под влиянием антропогенных факторов среды, прогнозировать “глубину” нарушений поведения вообще. Физиологический, в частности поведенческий, подход в биотестировании качества водной среды позволяет, кроме того, определить критерии врожденного поведения животных разного уровня филогенеза, которые наиболее чутко реагируют на малые дозы и концентрации физических и химических неблагоприятных факторов окружающей среды, оценка биологического действия которых представляет наибольший интерес в настоящее время.

Автор данной работы Н.А. Тушмалова предложила экспресс-метод определения токсичности водных сред, основанный на изменении спонтанной двигательной активности (СДА) инфузорий спиро-стом *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. [4]. Изучение механизмов поведенческих ответных реакций этих гидробионтов на загрязнение позволило сделать вывод, что изменение в поведении наступает значительно раньше и при меньших интенсивностях воздействия,

¹ Институт атомной энергетики НИЯУ МИФИ, 249040, г. Обнинск, Калужская обл., Студгородок, 1, кафедра биологии.

чем явные признаки отравления и гибель простейших. Это хорошо изучено для пестицидов, тяжелых металлов, фенолов, сверхмалых доз антиоксидантов и др. [5–7]. В фундаментальных эволюционно-физиологических исследованиях под руководством проф. Н.А. Тушмаловой [2, 8, 9] определено, что возникшие на заре эволюции закономерности проявления врожденных форм поведения у простейших донервных эукариот сохраняются и у более высоко организованных беспозвоночных, имеющих зачатки цефализации или развитую нервную систему и дифференцированный мозг. Несомненно, что в системе иерархии биологических критериев качества среды поведение может быть отнесено к реакциям “первого ранга”. В опытах на инфузориях [9] показателями исходного функционального состояния служили объективно регистрируемые реакции: спонтанная двигательная активность, уровень спонтанных сокращений, пищевой возбудимости, состояние ядерного аппарата простейших. Эксперименты продемонстрировали применимость основных физиологических показателей, используемых в опытах на позвоночных животных, для определения функционального состояния организмов, лишенных нервной системы.

Инфузорий относят к высокорезистентным объектам. Их повреждение гамма-квантами зарегистрировано в литературе при дозах порядка тысячи и более Грей [10]. Между тем в предварительных наблюдениях нами было показано, что уже после облучения в столь малой дозе, как 0,1 Гр, у подавляющего большинства спироостом через час после воздействия наблюдается выраженное снижение СДА по сравнению с контролем. Эти массовые нарушения не возрастали с ростом дозы в очень большом интервале (даже при увеличении дозы на 3 порядка), что отличало их от обычно изучаемых радиационных клеточных эффектов.

В данной работе отражено продолжение этих наблюдений, причем мы применили еще один показатель нарушения двигательной активности спироостом — учитывали частоту встречаемости патологических форм движения.

Материалы и методы исследования

В работе использовали лабораторную культуру инфузорий *Spirostomum ambiguum*, которые в норме имеют относительно большие размеры (длина 1–3 мм, диаметр 0,3–0,5 мм), что позволило наблюдать за ними при небольшом увеличении ($\times 2$) (рис. 1). С помощью продольного ряда мелких ресничек они равномерно плавают примерно со скоростью 2,5 мм/с. Эти гидробионты неприхотливы и хорошо размножаются в лабораторных условиях при оптимальной температуре $20 \pm 2^\circ$ на дехлорированной водопроводной воде [4, 11].

γ -Облучение спироостом осуществляли при повышенной температуре $28\text{--}30^\circ$ (как дополнительный неблагоприятный фактор) в виде суспензии в про-

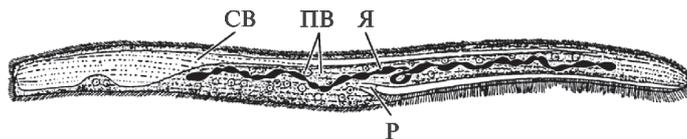


Рис. 1. *Spirostomum ambiguum* (увеличение 1800): Я — ядро, Р — реснички, ПВ — пищеварительная вакуоль, СВ — сократительная вакуоль

бирках в 6 мл воды на установках “Луч-1” (Россия, ^{60}Co , 22 сГр/мин) и “Исследователь” (Россия, ^{60}Co , 33 Гр/мин) в дозах 0,01; 0,1; 1; 20; 250; 500 и 850 Гр. Контрольную культуру приносили в помещение, где находятся установки, но облучению не подвергали. Эксперименты проводили при двойной шифровке проб. СДА исследовали у особей, которых отбирали случайным образом из массовой культуры контрольной группы и группы γ -облученных спироостом, а также на 2, 4 и 7-е сут, и помещали поодиночке в специальную камеру с лунками диаметром 5 мм и глубиной 2 мм. За каждой из спироостом наблюдали под микроскопом МБС-10, в окуляр которого помещали визир. Количественной мерой СДА служило число пересечений каждой особью визиров окуляра микроскопа за 1 мин. Одновременно фиксировали количество особей с морфологической патологией. Она проявлялась в форме “вертячек”, когда поступательное движение спироостом практически прекращалось и простейшие вращались на месте, и судорожных сжатий тела, когда форма простейших напоминала шар.

Спироостом после облучения культивировали в биологических пробирках при оптимальной для них температуре $20 \pm 1^\circ$ в виде массовой культуры. Питание осуществляли пищевыми дрожжами один раз в неделю. Результаты получены в 3 повторных сериях экспериментов, в каждой из которых тестировали по 20 особей в контроле и по 20 при каждой дозе облучения. Таким образом, протестировано более 1200 спироостом. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программы Microsoft® Excel'2003 SR-2 Origin® по параметрическому критерию Стьюдента. Стандартную ошибку для процента измененных показателей СДА и/или патологии оценивали по формуле $m(\%) = \pm \sqrt{\frac{P(100-P)}{n}}$, где P — показатель СДА или частота встречаемости патологии в опыте, %; n — численность спироостом в экспериментальной группе.

Результаты исследования

Рассмотрим данные о влиянии радиации в малых и более высоких дозах на СДА у спироостом сразу и в отдаленные сроки после γ -облучения. В табл. 1 приведены значения СДА у спироостом в абсолютных единицах (количество пересечений визира окуляра) в каждой серии экспериментов, полученные сразу после γ -облучения простейших в до-

Таблица 1

Изменение СДА у спиростом в трех сериях опытов сразу после γ -облучения простейших в дозах 0,01; 0,1; 1; 20; 250; 500 и 850 Гр

№ опыта	Доза, Гр							
	0	0,01	0,1	1,0	20	250	500	850
1	1,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,4 ± 0,06	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,5
2	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,8 ± 0,4	2,0 ± 0,5	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,5	0,8 ± 0,1
3	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,2	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,6
<i>M ± m</i>	2,1 ± 0,2	1,4 ± 0,5*	1,4 ± 0,6*	1,5 ± 0,2*	1,1 ± 0,6*	1,0 ± 0,6*	1,5 ± 0,3*	1,2 ± 0,7*

Примечание. *M ± m* — средние значения величин с квадратичной ошибкой в единицах СДА, при *n* = 60; * — различия достоверны при *p* < 0,05.

зах 0,01; 0,1; 1; 20; 250; 500 и 850 Гр, а на рис. 2 — средние показатели СДА в опыте, представленные в % относительно среднего контроля.

Из табл. 1 видно, что снижение СДА происходит во всех сериях опытов даже при тестировании небольшой выборки простейших. Рис. 2 наглядно демонстрирует, что снижение СДА происходит уже при дозе 0,01 Гр, причем изменения практически одинаковы во всем исследованном дозном интервале и составляют в среднем 45% относительно контроля.

Тем самым мы подтвердили полученные ранее результаты [12] о высокой радиочувствительности спиростом по признаку снижения СДА, дозозависимость этого эффекта, проявление и возможность его регистрации практически сразу после γ -облучения простейших.

В последующих опытах изучали СДА у спиростом на разных сроках после радиационного воздействия. В табл. 2 представлены значения этого показателя в абсолютных величинах в контроле и при дозах 0,01–850 Гр на 2, 4 и 7-е сут после облуче-

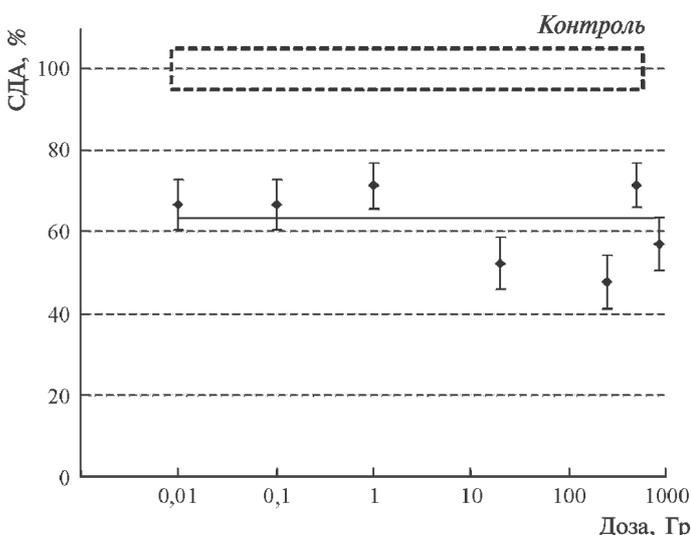


Рис. 2. Изменение СДА у спиростом в % относительно контроля в трех сериях экспериментов сразу после γ -облучения простейших в дозах 0,01; 0,1; 1; 20; 250; 500 и 850 Гр. Количество исследованных спиростом при каждой дозе и в контроле составляет 60 особей

ния. Видно, что во всех случаях имеется достоверное (*p* < 0,05) снижение СДА в среднем на 45%, которое примерно одинаково на всех сроках наблюдения и при всех использованных дозах. Известно, что спиростомы в культуре делятся в среднем через 1–2 сут. Следовательно, негативный эффект сохранялся при вегетативном делении в 2–3 генерациях простейших. Важно отметить, что при γ -облучении спиростом при повышенной температуре (28–30°) были зафиксированы дополнительные проявления негативного действия радиации.

Таблица 2

Значения СДА у спиростом (в абсолютных величинах) в контроле и при дозах 0,01–850 Гр на разных сроках после облучения

Доза, Гр	Сутки			
	0	2	4	7
	<i>M ± m</i> ¹			
0 (Контроль)	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,5
0,01	1,4 ± 0,5*	0,9 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*	1,0 ± 0,5*
0,1	1,0 ± 0,8*	1,0 ± 0,06*	0,7 ± 0,2*	0,5 ± 0,0*
1,0	1,5 ± 0,2*	1,0 ± 0,3*	0,8 ± 0,3*	1,0 ± 0,2*
20	1,1 ± 0,6*	0,5 ± 0,06*	1,0 ± 0,1*	1,2 ± 0,5*
250	1,0 ± 0,6*	0,6 ± 0,05*	1,0 ± 0,2*	0,8 ± 0,5*
500	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*	0,8 ± 0,2*
850	1,2 ± 0,7*	0,6 ± 0,3*	0,6 ± 0,2*	0,8 ± 0,4*

¹*M ± m* — средние значения величин с квадратичной ошибкой, при *n* = 60; * — отличия опыта от контроля достоверны при *p* < 0,05.

Эффект проявлялся не только в снижении СДА облученных спиростом, но и в появлении таких ярко выраженных функциональных расстройств, как реакции-“предвестники гибели” — судорожные подергивания тела, изменение характера движения от “прямолинейного” до “верчения”, попятные движения или полная неподвижность спиростом. На рис. 3 показаны физиологическая норма (рис. 3, а), харак-

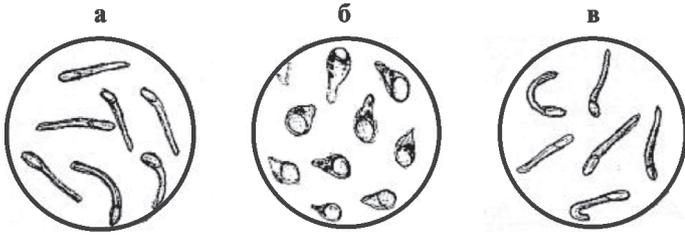


Рис. 3. Физиологическая норма (а) и наблюдаемая нами после γ -облучения морфологическая патология: сжатия (б) и “вертячки” (в) у спиростом

терная для контрольной группы простейших, и наблюдаемая нами морфологическая патология движения спиростом после γ -облучения. Характер патологии был однотипным при увеличении дозы от 0,01 до 850 Гр и проявлялся в виде судорожных сжатий тела простейших (рис. 3, б) или “вертячек” (рис. 3, в).

В табл. 3 приведены результаты количественного учета случаев морфологической патологии у подопытных особей сразу и в отдаленные сроки (2–7 сут) после γ -облучения в дозах 0,01; 0,1; 1; 20; 250 и 850 Гр в трех сериях опытов (абсолютные величины).

Таблица 3

Среднее количество случаев морфологической патологии в контроле и на разных сроках после γ -облучения в дозах 0,01–850 Гр в трех сериях опытов

Доза, Гр	Сутки			
	0	2	4	7
0 (Контроль)	0	0	0	$0,7 \pm 0,5$
0,01	$12,3 \pm 1,5$	$0,3 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,6$	$4,0 \pm 1,0$
0,1	$1,3 \pm 0,9$	$1,3 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,8$	$4,7 \pm 3,2$
1,0	$3,7 \pm 2,4$	$3,3 \pm 1,4$	$1,7 \pm 0,9$	$3,3 \pm 0,9$
20	$3,3 \pm 2,4$	$7,0 \pm 2,7$	$10,0 \pm 1,3$	$3,3 \pm 1,7$
250	$3,7 \pm 1,8$	$4,7 \pm 1,1$	$7,0 \pm 3,5$	$3,7 \pm 1,2$
850	$3,0 \pm 1,5$	$4,3 \pm 1,8$	$8,0 \pm 2,5$	$4,7 \pm 0,3$

¹ $M \pm m$ — средняя встречаемость морфологической патологии (“вертячки”, сжатия) с квадратичной ошибкой в абсолютных единицах.

Видно, что в контрольной группе морфологическая патология движения отсутствует и появляется сразу после γ -облучения простейших. Из табл. 3 также видно, что морфологическая патология у подопытных спиростом сохраняется в течение всего периода наблюдения (как минимум до 7 сут). Известно, что такие изменения, если они развиваются, оказываются необратимыми и неизбежно ведут к гибели инфузорий, даже если их поместить в чистую среду [4]. На рис. 4, где средняя встречаемость патологии, наблюдаемая сразу после γ -облучения спиростом, выражена в % к соответствующему контро-

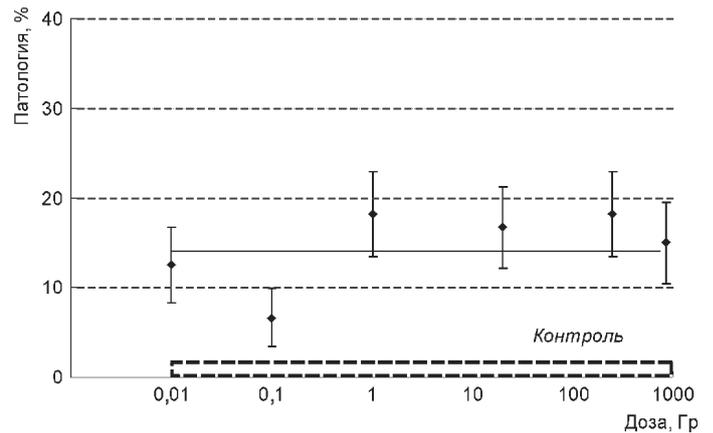


Рис. 4. Изменение частоты встречаемости морфологической патологии у спиростом в % относительно контроля в трех сериях экспериментов сразу после γ -облучения простейших в дозах 0,01; 0,1; 1; 20; 250 и 850 Гр.

Количество исследованных спиростом при каждой дозе и в контроле составляет 60 особей

лю, видно, что патология имеет место уже в дозе 0,01 Гр и сохраняется практически с одной частотой в широком диапазоне доз от 0,1 до 850 Гр, что согласуется с появлением негативного эффекта по признаку снижения СДА у простейших (рис. 2).

Итак, воздействие γ -радиацией в малых для объекта дозах вызывает у спиростом наследуемое повышение частоты появления морфологической патологии, которая не возрастает даже при очень большом увеличении дозы. Тем самым мы получили убедительные данные о высокой радиочувствительности спиростом и о дозозависимости полученного эффекта как по признаку снижения СДА, так и по другому признаку — повышению частоты случаев морфологической патологии движения простейших.

Похожие закономерности были обнаружены в работах И.Б. Бычковой с соавт. [13], где у разных объектов, в том числе инфузорий других видов (*Paramecium caudatum* и *Climacostomum virens*), помимо традиционно изучаемых клеточных изменений, возрастающих с ростом дозы, обнаружили особые массовые дозозависимые эффекты, которые индуцируются уже низкими для объектов дозами радиации. Это убеждает в реальности полученных нами результатов.

Заключение

Оценка СДА у спиростом занимает считанное время [4, 12]. В соответствии с этим полученные результаты могут быть положены в основу разработки экспресс-метода для биотестирования радиоактивного загрязнения окружающей среды и дальнейшего исследования описанного нами наследственного повреждения. Это не только обогатит представления о биологическом действии радиации в малых дозах, но и откроет новые подходы к нормированию действия радиации на биоту.

Показана прогностическая роль эволюционно универсальной формы поведения — двигательной активности простейших в выборе стратегии даль-

нейших исследований негативного влияния факторов окружающей среды на биоту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Слоним А.Д. Энергетика поведения и спонтанная деятельность. Л.: Наука, 1971.
2. Тушмалова Н.А. Основные закономерности эволюции поведения беспозвоночных. Физиология поведения. Л.: Наука, 1987. С. 236—265.
3. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989. 142 с.
4. Тушмалова Н.А., Данильченко О.П., Бресткина М.Д. Метод биотестирования природных и сточных вод по уровню двигательной активности инфузорий спиростом // Методы биотестирования природных вод. Черногоровка, 1988. С. 43—47.
5. Бахвалова Е.В., Егорова Е.И., Тушмалова Н.А. Поведение инфузории спиростомы как индикатор наличия тяжелых металлов в водной среде // Биология внутренних вод. 2007. № 2. С. 100—104.
6. Тушмалова Н.А., Бурлакова Е.Б., Лебедева Н.Е., Томкевич М.С., Головкина Т.В. Поведение донервных организмов — индикатор эффекта сверхмалых доз // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 1998. № 4. С. 24—25.
7. Тушмалова Н.А., Егорова Е.И. Использование поведенческих реакций гидробионтов в системе оценки качества окружающей среды. Обнинск: ИАТЭ, 2003. 52 с.
8. Козлов А.Т., Тушмалова Н.А. Структура и механизмы поведения беспозвоночных. Воронеж: Квадрат, 1995. 149 с.
9. Тушмалова Н.А. Функциональные механизмы приобретенного поведения у низших беспозвоночных. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. 107 с.
10. Choppin G., Rydberg J., Liljenzin J.O. Radiochemistry and Nuclear Chemistry. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 1995. P. 473—512.
11. Мелехова О.П., Егорова (Сарапульцева) Е.И., Евсеева Т.И. и др. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: Учеб. пособие / Под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой (Сарапульцевой). М.: Академия, 2007, 2008, 2010. 288 с.
12. Сарапульцева Е.И. Спонтанная двигательная активность инфузорий *Spirostomum ambiguum* после γ -облучения в широком диапазоне доз как информативный метод биотестирования // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 3. С. 346—348.
13. Бычкова И.Б., Федорцева Р.Ф., Антонов П.В. и др. Особые клеточные эффекты и соматические последствия облучения в малых дозах. СПб: СПМКС, 2006. 150 с.

Поступила в редакцию
25.02.10

MOTOR ACTIVITY OF PROTOZOA: LOCATION OF MOTOR ACTIVITY IN THE HIERARCHY OF CRITERIA BIOASSAY ENVIRONMENT

E.I. Sarapultseva, N.A. Tushmalova

In model experiments on the protozoa *Spirostomum ambiguum* Ehrbg stable dose-independent behavior change under the action of low radiation was studied. We have shown that even at a dose of 0,01 Gy, which is thousands times lower than predicted as lethal (1000 Gy), increases the probability of spontaneous motor activity decreases. The negative effect is inherited by several generations spirostom. Reduced motor activity is accompanied by morphologic violations of the protozoa, a manifestation of which is also dose-independent nature in a wide range of doses. It is discussion of biological testing of radioactive contamination of the environment using the criterion of change in motor activity of the protozoa and prospective studies of such effects.

Key words: motor activity, protozoa, low radiation dose, express-method of bioassay, radioactive contamination of the environment.

Сведения об авторах

Сарапульцева Елена Игоревна — канд. биол. наук, доц. кафедры биологии ИАТЭ НИЯУ МИФИ. Тел. (48439)3-11-79; e-mail: selena@iate.obninsk.ru

Тушмалова Нина Александровна — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности (ВНД) биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-50-01.