

ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.192.546

ДИАЛИЗНАЯ КУЛЬТУРА КАК ИНДИКАТОР ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВОДНЫХ РЕСУРСОВ

**Я.В. Савания, И.А. Фомина, Е.Л. Барский, С.Ю. Королева*,
Ю.Н. Королев, Е.С. Лобакова**

(кафедра биоинженерии; e-mail: cordekor@list.ru)

Рассматриваются данные контроля состояния водной экосистемы, полученные при регистрации изменений пространственно-временных параметров целых клеток и их внешних структур с использованием спектроскопии внутреннего отражения. В качестве биоиндикатора применяется диализная культура микроводорослей с контролируемой “внешней средой”.

Ключевые слова: микроорганизмы, диализное культивирование, спектроскопия внутреннего отражения.

Основной и до сих пор не решенной проблемой поддержания качества среды и управления природными ресурсами в целом является проблема отсутствия репрезентативных методов и методологий оценки состояния среды. Многолетний опыт использования нормативов ПДК (предельно допустимых концентраций в среде некоторого набора веществ) и квот на выбросы загрязнителей показал, что они не являются реальной границей между опасностью и безопасностью, а служат скорее обозначением некоторого уровня риска, различного не только для организмов, составляющих экосистемы, но даже для разных групп населения [1]. Как следствие в системе мониторинга поверхностных пресных вод наблюдается переход от чисто химического контроля к биологической концепции — помимо норм ПДК в системе экологического контроля используются биотесты.

При всем разнообразии подходов к решению данной проблемы ни один из них не привел пока к разработке какого-либо метода, который можно было бы безоговорочно рекомендовать для практического использования [2, 3]. Именно поэтому в существующих системах экологического мониторинга применяются главным образом экспертные оценки качества природной среды. Методы, основанные на анализе видового состава, требуют серьезных предварительных исследований для установления состава сообщества и его динамики при различных изменениях среды. Так, при проведении экологического мониторинга пресных вод определяют обилие и видовой состав планктона, перифитона и зообентоса, а состояние каждого из этих биотических идентификаторов оценивается путем расчета. Биотические отношения между популяциями в сообществе, такие как конкуренция,

мутуализм и др., как правило, не учитываются. В качестве возможного интегрального показателя нормы или патологии для функционирования экосистем, т.е. своеобразного “градусника”, с помощью которых можно было бы отличить экологически благополучную экосистему от экосистемы, в которой произошли существенные изменения, вызванные внешними (в первую очередь антропогенными) воздействиями, рассматривались анализ ранговых распределений численности или биомассы групп живых организмов; градации состояния экосистем или показатели продуктивности их высших трофических звеньев [2–4].

Однако абсолютных биологических величин, имеющих одинаковый смысл для всех экосистем независимо от типа и географического положения последних, не существует. Равными количественными характеристиками (например, одним и тем же значением первичной продукции) могут обладать экосистемы, находящиеся в принципиально различных состояниях. Только основные качественные состояния инвариантны для всех без исключения водных экосистем. Каждое из этих состояний соответствует определенному уровню антропогенной нагрузки, что является объективным критерием для научно обоснованного экологического нормирования [4].

Если распространить на сообщество принцип, “запрещающий” избыточную организацию организма, то необходимо признать, что наибольшая приспособленность системы к устойчивому существованию в конкретных условиях среды достигается при строго определенном, обусловленном свойствами среды уровне организации этой системы. Превышение необходимого уровня организации уменьшает приспособленность системы к условиям ее существования. Среда, в которой существуют биоценозы, оказывает-

* Международный университет природы, общества и человека “Дубна”.

ся фактором, определяющим и интенсивность метаболизма биоценозов, и уровень их организации.

Функциональные изменения свойств сообщества связаны с изменением его структуры. Отдельные структурные показатели хотя и отражают особенности этой связи, но сами по себе оказываются недостаточными для ее полного описания. Вместе с тем на особенности этой связи оказывают воздействие изменения физиологического состояния отдельных популяций при эксплуатации общего биотопа. Все это приводит к необходимости отыскания такого обобщенного показателя, который, учитывая структурные характеристики сообщества, отражал бы при этом особенности его физиологического состояния [5].

В данной работе предлагается один из вариантов оценки того, насколько сама среда благоприятна (или неблагоприятна) для населяющих ее организмов. Данный подход связан с характеристикой именно физиологического состояния сообщества, в данном случае — для контроля качества водной среды. Для оценки качества водной среды из природных водоемов используется диализная культура одноклеточных цианобактерий. Состояние культуры определяется по разности степеней дихроизма полос поглощения электромагнитного излучения целых клеток и их внешних слоев после взаимодействия излучения с клетками, т.е. по степени пространственной организации клеток диализной культуры.

Материалы и методы

Материалом служили пробы воды (1,5 л), отобранные в фотической зоне (до 5 м) в разных точках бассейна р. Москвы в период с ноября 2010 г. по январь 2012 г.

Культура цианобактерии *Synechocystis* sp. *PCC 6301* выращивалась в стандартных условиях при освещенности 100 Вт/м², 20–25°C и круглосуточном освещении на минеральной среде “С” [6]. 7–9-суточная культура помещалась в диализный мешок, истощалась на минимальной среде (разбавленной по основным компонентам в 3 раза, без микроэлементов и железа) 2–3 сут. В том же мешке культура переносилась в объем, содержащий воду из исследуемого водоема, и выдерживалась 3–7 сут. Далее клеточная суспензия центрифугировалась при 6 тыс. об/мин. Отдельно исследовали клетки, *Synechocystis* sp., содержащиеся в диализном мешке, и фитопланктон, накопившийся во “внешнем” объеме.

Изменения состояния культуры определяли путем последовательных измерений интенсивности электромагнитного излучения при азимутах поляризации 0° и 90° на выходе находящегося в контакте с клетками диализной культуры материалом измерительного элемента спектроскопии внутреннего отражения (метод непрямого внутреннего отражения) [7], параметры которого выбирают исходя из условий получения спектров как целых клеток, так и их внешних слоев (без разрушения клеток). Затем производится

расчет степени дихроизма для клеток P_1 и их внешних структур P_2 и берется разность между полученными данными. Стремление этой разности к нулю означало, что сообщество водных организмов приближается к потере физиологической активности. Возрастание же указанной разности характеризовало увеличение физиологической активности сообщества организмов данной водной экосистемы. Анализ основан в том числе на том, что физико-химические характеристики водной среды влияют на параметры клеток диализной культуры, что находит отражение в спектральных характеристиках, а это в сумме влияет на выбор параметров измерительного элемента:

$$0,5d = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{1/2}},$$

где d — диаметр клеток, λ_1 — длина волны в измерительном элементе, θ — угол падения светового потока на рабочую поверхность измерительного элемента, $n_{21} = n_2/n_1$ — относительный показатель преломления, n_1 — показатель преломления измерительного элемента, n_2 — показатель преломления клеток (если это значение неизвестно, то его можно определить, пользуясь [7]).

По отношению интенсивностей полос поглощения для азимутов поляризации 0° и 90° получают данные о степени дихроизма для целых клеток $P_1 = (A_{||} - A_{\perp})/(A_{||} + A_{\perp})$.

Параметры измерительного элемента для внешних структур клеток выбирают, исходя из того, что их толщина составляет примерно 0,1d (эта величина определяется строением клеток конкретных объектов) [8].

По отношению интенсивностей полос поглощения для азимутов поляризации 0° и 90° получают данные о степени дихроизма для внешних структур клеток P_2 , а по разнице степеней дихроизма ($P = P_1 - P_2$) определяют состояние диализной культуры, которое проектируют на физиологическую активность сообщества организмов водной среды [9].

Результаты и обсуждение

При выборе диализной культуры одноклеточных цианобактерий для исследований учитывались:

1) широкая распространенность: “цветение” водоемов в наших широтах вызывается главным образом цианобактериями;

2) важная роль в формировании природных сообществ и способность к концентрации загрязнителей: сообщества, преобладающим компонентом которых являются цианобактерии, удаляют из водной среды до 98% растворенных металлов и металлоидов;

3) чувствительность многих видов цианобактерий к воздействию ряда загрязнителей, что объясняется мелкими размерами клеток, обеспечивающими высокое соотношение поверхность/объем, а также вы-

раженной зависимостью физиолого-биохимических ответов клеток на действующие физико-химические факторы среды (обмен веществ между клеткой и микроорганизмом и средой осуществляется всей ее поверхностью).

Диализное культивирование представляет собой одну из разновидностей иммобилизованных культур. Исследуемая суспензионная культура отделена от “внешнего объема” среды мембраной с размерами пор, пропускающих соединения с определенной молекулярной массой, через которую осуществляется диффузия веществ. Метод известен с 70-х гг. XX в. и использовался главным образом для биоиндикации (влияния экологических факторов на фитопланктон): взятая проба фитопланктона помещалась в камеру, с двух сторон ограниченную полупроницаемой мембраной, и возвращалась в исследуемый водоем [10]. В данном случае предлагается использовать чистые лабораторные культуры цианобактерий и микроводорослей (для стандартизации физиологических откликов), т.е. этот метод относится к биотестированию. Особенности метода лучше проявляются при максимальном соотношении поверхности и объема диализной мембранны: лучшая форма диализного мешка не шар, а длинный цилиндр, полностью погруженный в 5–10-кратный объем “внешней среды”, что обеспечивает непрерывное поступление питательных веществ и отток метаболитов, ингибирующих клеточное деление. Диализная мембрана разделяет внеклеточные метаболиты на высокомолекулярные, накапливающиеся в диализном мешке, и низкомолекулярные — во внешнем объеме [11]. Полученная система представляет упрощенную модель функционирования природной биопленки цианобактерий (т.е. биологического сообщества): во “внутреннем” объеме накапливаются высокомолекулярные полисахариды, которые объединяют отдельные клетки и создают вокруг них специфические условия — организмы развиваются не в водно-солевой среде, а в коллоидном матриксе, опосредующем воздействия внешней среды на организм.

Наибольшей чувствительностью к токсическим воздействиям характеризуются культуры физиологически молодых клеток, выращенных на минимальных средах. Таким образом, условием получения тест-культур, наиболее отвечающих свойствам природной популяции, является истощение клеточных резервов. Культуру в диализном мешке легко перемещать из одной среды в другую: на минимальных средах это позволяет обеспечивать истощение клеточных резервов для увеличения чувствительности культур при одновременном удалении продуктов автоингибирования. Клетки в диализном мешке остаются в стерильных условиях, что позволяет изучать физиологические изменения культур в любых загрязненных средах, включая естественные водоемы [11].

Изменения, вызываемые воздействием (в росте, дыхательной активности и пр.), могут наблюдаться как непосредственно после воздействия, так и с за-

держкой от нескольких часов до нескольких дней. Стандартные измеряемые параметры культур микроводорослей (чувствительные к условиям культивирования) включают: содержание хлорофилла *a*, подсчет числа клеток, биомассу, объем клеток, активность фотосинтеза и др. [12]. Это требует значительного времени анализа, снижает точность и воспроизводимость анализа и не позволяет использовать его для непосредственного построения автоматизированных устройств контроля, либо метод определения не дает одинаковых результатов. Поэтому в данной работе был использован безразмерный показатель, который, учитывая структурные характеристики сообщества, отражает и особенности его физиологического состояния.

На первом этапе была проведена серия экспериментов на чистой культуре цианобактерий, выращиваемой на минеральной среде в разных режимах культивирования. Результаты этой проверки представлены в работе [13]. Культура цианобактерий одного этапа развития (логарифмическая фаза роста), выращенная на одной и той же питательной среде при постоянной освещенности, характеризуется подобием полученных результатов, которые практически не зависят от времени года.

Материалом для следующего этапа работы послужили пробы поверхностных вод, собранные в период с ноября 2010 г. по январь 2012 г. в разных точках бассейна р. Москвы и проанализированные по методике, описанной выше. Вода, взятая из природных водоемов, в зависимости от содержания в ней разнообразных химических соединений изменяет физиологическое состояние диализной культуры, экстраполируемое на физиологическое состояние (физиологическую активность) сообщества конкретного водоема.

На рисунках представлены результаты исследования проб, взятых у с. Каринское (выше г. Звенигород) и у места впадения р. Истра в р. Москва (Дмитровское). Выбор точек был определен тем, что характер и степень загрязнения (атмосферного, автотранспортного, бытовыми и промышленными стоками) в местах отбора проб могут сильно различаться из-за разных температурных режимов, разной освещенности, из-за наличия промышленных предприятий, разных скоростей течения и т.д.

На рис. 1 представлены сезонные изменения физиологического состояния диализной культуры цианобактерий под действием ряда факторов, действующих на водные организмы в указанных точках контроля, выраженные через обобщенный безразмерный показатель Р.

Для проверки возможности экстраполяции данных, полученных при исследовании диализной культуры, на показатели физиологической активности природных сообществ микроводорослей результаты исследований сопоставлялись с показателями сообществ микроводорослей, собранных в указанных точках в сроки, соответствующие времени забора проб (даные по основным группам микроводорослей и ряду

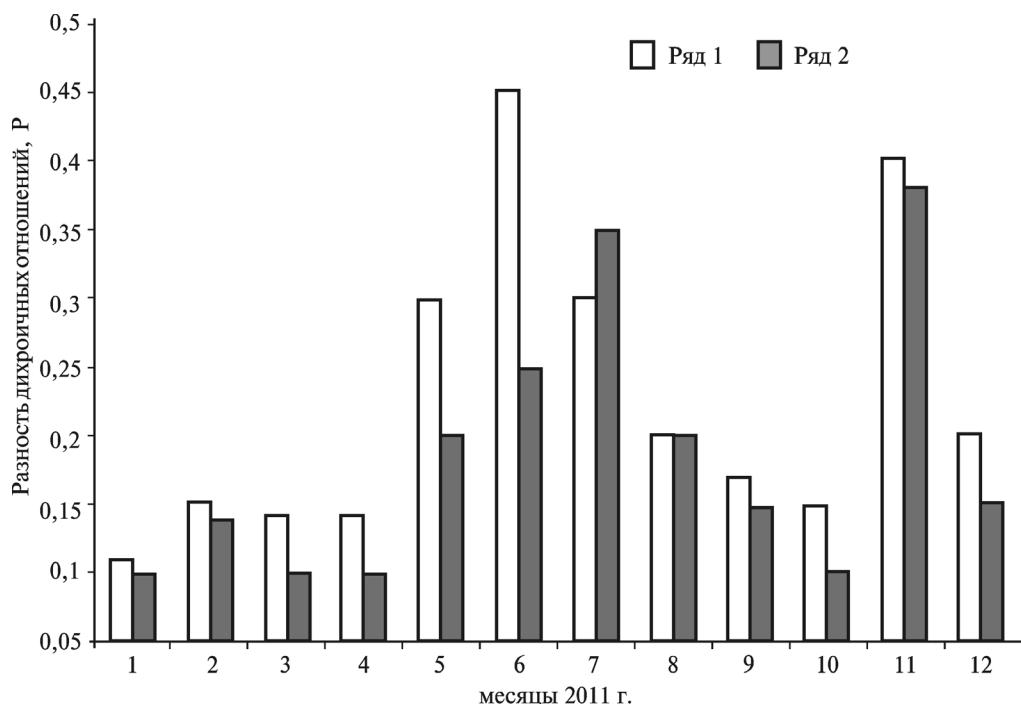


Рис. 1. Разность дихроичных отношений, рассчитанная для диализной культуры при тестировании проб воды, отобранных в течение года в двух точках р. Москва: 1-й ряд — Каринское; 2-й ряд — Дмитровское

химических факторов предоставлены МГУП “Мосводоканал”), а также с результатами лабораторных исследований фитопланктона, нарастающего во внешнем объеме. Результаты, полученные для общего числа клеток и биомассы сообществ микроводорослей из мест отбора проб, представлены на рис. 2, 3.

Характер физиологических изменений микроводорослей изучался в условиях, когда воздействие комплекса физико-химических параметров среды зависело от сезонных изменений. Последнее обстоятельство существенно для сообщества микроводорослей, структура которого целиком определяется взаимоотношениями между видами. Рассмотрим по-

этапно эти периоды. Известно, что в течение безледного сезона в водоемах происходит последовательная смена основных альгологических комплексов.

Биологическая весна. Начало биологической весны приурочено к первым числам апреля. Весенняя вспышка фитопланктона, начавшись подо льдом, достигает максимума по биомассе и по общей численности в мае (максимальное содержание питательных веществ, связанное с поверхностным смывом). Известно, что в период наиболее интенсивного нарастания биомассы в мае происходит весенняя вспышка зоопланктона [5]. Это приводит далее к падению численности биомассы фитопланктона. Но уже не-

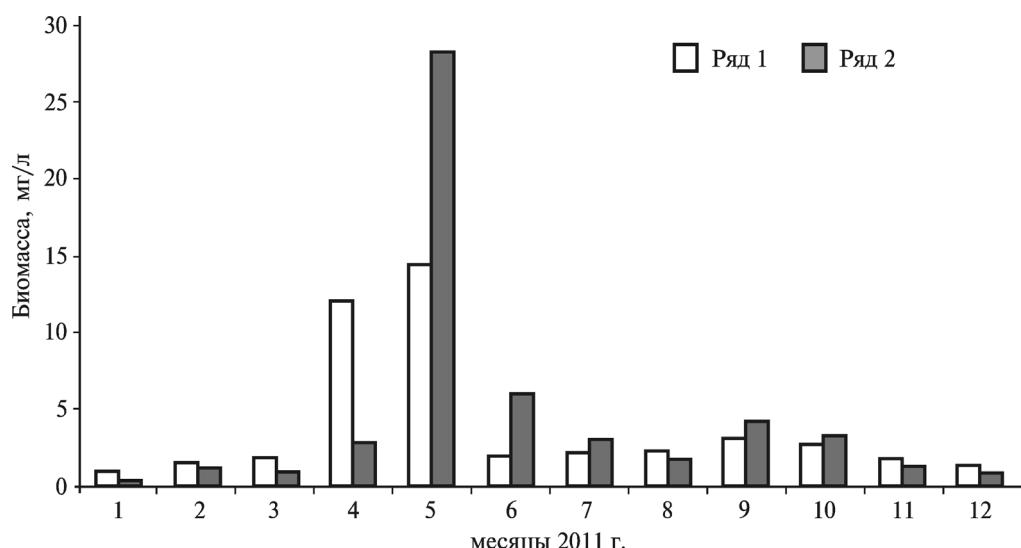


Рис. 2. Биомасса сообществ микроводорослей в местах отбора проб: 1-й ряд — Каринское; 2-й ряд — Дмитровское

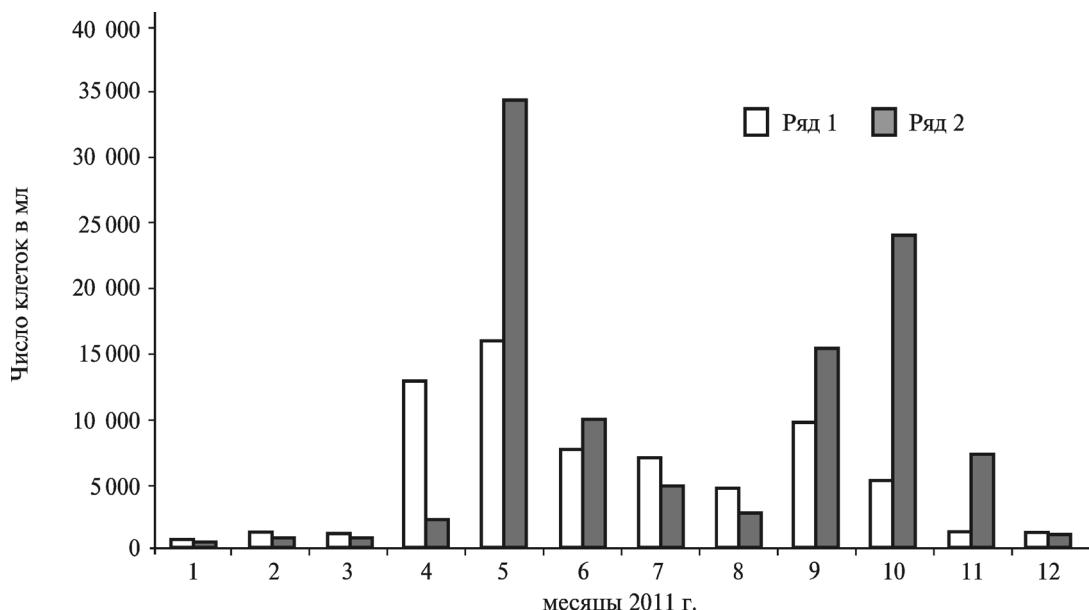


Рис. 3. Общее число клеток сообществ микроводорослей в местах отбора проб: 1-й ряд — Каринское; 2-й ряд — Дмитровское

большое снижение биомассы фитопланктона приводит к снижению пищевой конкуренции. В этот период (минимум конкуренции) происходит повышение относительной роли крупных форм, что хорошо видно из сопоставления за этот период динамики численности и биомассы фитопланктонных организмов. В июне резко падает численность и биомасса, что совпадает с окончанием биологической весны в водоеме.

Биологическое лето. Можно считать, что биологическое лето начинается в июне интенсивной сукцессией фитопланктона, которая приурочена к “температурному скачку” в поверхностном горизонте. Летняя сукцессия сопровождается ослаблением конкурентных отношений (очевидно, за счет преемственности, обусловленной положением, когда результат изменения биотопа вследствие развития популяций одного организма благоприятен для вспышки последующего) и падением удельной активности сообщества с июля. Далее устанавливается летний климакс с примерно постоянной биомассой. Взаиморегулирование численности в данный период приводит к вытеснению крупных форм более мелкими, что хорошо иллюстрируется сравнением кривых численности и биомассы (рис. 2, 3). Наступающее затем снижение численности вследствие летней сукцессии зоопланктона приводит к “разбалансировке” системы, охватывающей август и начало сентября. Тем не менее факт ослабления пищевой конкуренции находит подтверждение в новом подъеме продуктивности сообщества.

Биологическая осень. Начало осени совпадает с падением температуры в водоеме, которое приурочено к последней декаде августа. Осенняя вспышка происходит более вяло, охватывая конец августа — сентябрь, и регистрируется только по изменению биомассы в пробах этого периода. Период осенней сук-

цессии характеризуется попыткой вернуть систему в новое устойчивое состояние.

Дальнейшее падение температуры выступает как фактор, лимитирующий развитие микроводорослей. Таким образом, если весенне и летнее падение биомассы фитопланктона определяется биотическим фактором, то осенне падение обусловлено абиотическим фактором среды (температурой и, возможно, снижением суммарной солнечной радиации). Независимо от природы действующего фактора осенне разрежение плотности фитопланктонных организмов изменяет их отношения друг с другом.

Таким образом, относительное обилие видов сообщества микроводорослей в сбалансированной системе (период климакса) приводит к обострению конкуренции за дефицитные пищевые ресурсы и снижению относительной продуктивности живой компоненты экосистемы. Ослабление пищевой конкуренции, характерное для периода сезонных сукцессий сообщества микроводорослей, обеспечивает его высокую относительную продуктивность.

Заключение. При анализе структуры любого сообщества важным критерием является характер распределения численности по видам.

Функциональные изменения свойств сообщества связаны с изменением структуры, и отдельные структурные показатели хотя и отражают особенности этой связи, но сами по себе оказываются недостаточными для ее полного описания. Вместе с тем на особенности этой связи оказывают воздействие изменения физиологического состояния отдельных популяций при эксплуатации общего биотопа в условиях ограниченности резервов питания. Все это приводит к необходимости отыскания такого обобщенного показателя, который, учитывая структурные характеристики сообщества, отражал бы при этом особенности его физиологического состояния, т.е. задача

сводится к получению такой функции, с помощью которой по измеренным или рассчитанным структурным показателям сообщества можно определить его физиологическую активность.

Применение обобщенных безразмерных показателей структуры и функции отражает результат воздействия на сообщество всей совокупности факторов окружающей среды (обеспеченности питанием, пространством, светом и т.д.), вследствие чего использование их оказывается более успешным, чем отыскание частных связей между отдельными факторами внешней среды и функциональными показателями системы.

Выводы

1. Получен обобщенный безразмерный показатель, который, учитывая структурные характеристики сообщества, отражает при этом особенности его физиологического состояния, т.е. получена такая функция, с помощью которой по измеренным или рассчитанным структурным показателям сообщества можно определить его физиологическую активность.

2. Проведенные исследования показали возможность практического использования предложенного

подхода при изучении естественных сообществ микроводорослей. При этом продолжительность опыта должна существенно превышать среднее время генерации для массовых форм микроводорослей в исследуемом водоеме, так как истинное влияние, оказываемое тем или иным фактором на процесс новообразования органического вещества, проявляется через интервал времени, необходимый для получения отклика в производящей системе, — в изменении численности и состава микроводорослей.

3. Предложенный подход позволяет изучать влияние на первичную продукцию концентрационных соотношений всех факторов воздействия.

4. Методика позволяет исследовать связь между показателем зрелости системы и ее функциональной активностью.

5. Предложенный подход позволяет проследить сезонные изменения “первичных” показателей структуры (суммарной численности особей, биомассы) и характеристику активности сообщества, показано отсутствие прямой связи между этими показателями.

6. Предложенный подход позволяет показать отличие абиотических факторов воздействия на сообщества микроводорослей в различных точках водоема.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смурров А.В. Экологическая диагностика качества среды обитания на примере наземных сообществ района Южно-Уральского радиоактивного следа и донных сообществ залива Нячанг Южно-Китайского моря: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ, 2003.
2. Булгаков Н.Г. Индикация состояния природных экосистем и нормирование факторов окружающей среды: обзор существующих подходов // Усп. совр. биол. 2002. Т. 122. № 2. С. 115—135.
3. Максимов В.Н., Булгаков Н.Г., Левич А.П. Количественные методы контроля: диагностика, нормирование, прогноз // Тр. Междунар. конф. “Экополис 2000”. М.: МГУ, 2000. С. 79—83.
4. Абакумов В.А. Экологические модификации и развитие биоценозов // Тр. Междунар. симпоз. “Экологические модификации и критерии экологического нормирования”. Л.: Гидрометеоиздат, 1991. С. 18—48.
5. Федоров В.Д. Экспериментально-экологическое изучение структуры и функции фитопланктона как сообщества: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ, 1970. 56 с.
6. Kratz W.A., Myers J. // Nutrition and growth of several blue-green algae // Am. J. Bot. 1955. Vol. 42. P. 2282—2287.
7. Харрик Н. Спектроскопия внутреннего отражения. М.: Мир, 1970. 345 с.
8. Королева С.Ю. Разработка адекватной модели оценки состояния экосистемы на примере популяции микробиорганизмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2010. 24 с.
9. Дуда В.И., Королев Ю.Н., Эль-Регистан Г.И., Дужа М.В., Телегин Н.Л. Распределение и пространственная упорядоченность молекул биополимеров в покоящихся бактериальных спорах // Микробиология. 1978. Т. 47. Вып. 4. С. 750.
10. Sakshaug E. Limiting nutrients and maximum growth rates for diatoms in Narragansett bay // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1977. Vol. 28. N 109. P. 123.
11. Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л., Гусев М.В. Диализное культивирование цианобактерий // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2008. № 2. С. 16—25.
12. Shubert L.E. Algae as ecological indicators. London: Academic press. inc., 1984. P. 213—237.
13. Барский Е.Л., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Королева С.Ю., Королев Ю.Н. Лобакова Е.С. Сравнительный анализ пространственно-временной организации биологических систем в периодической и диализной культурах цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6301 // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2010. № 3. С. 20—26.

Поступила в редакцию
26.11.12

DIALYSIS CULTURE AS AN INDICATOR OF CHANGES IN WATER RESOURCES

Ya.V. Savanina, I.A. Fomina, E.L. Barsky, S.Yu. Koroleva, Yu.N. Korolev, E.S. Lobakova

The possibility of monitoring the status of aquatic ecosystems, based on registration of changes of spatio-temporal parameters of whole cells and their external structures using internal reflection

spectroscopy. As a bioindikator used dialysis culture of microalgae with controlled “external environment”.

Key words: *microorganisms, dialytical cultivation, attenuated total reflection.*

Сведения об авторах

Саванина Янина Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Фомина Ирина Алексеевна — аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Барский Евгений Львович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Королева Светлана Юрьевна — канд. биол. наук, доцент кафедры экологии и природопользования Международного университета природы, общества и человека “Дубна”, Россия. Тел.: 8-499-128-63-11; e-mail: cordekor@list.ru

Королев Юрий Николаевич — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: cordekor@list.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-07; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru