

УДК 574.64:57.017.3

АДАПТАЦИЯ ИНFUЗОРИЙ *PARAMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM* К СОЛЯМ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ¹

© 2006 А.Е. Васин²

В хроническом эксперименте исследована способность инфузорий *Paramecium multimicronucleatum* адаптироваться к действию солей Cd, Ni, Cu и Pb.

Введение

На данный момент тяжелые металлы считаются одной из наиболее опасных групп токсикантов, попадающих с бытовыми и промышленными отходами в окружающую среду [1]. В отличие от органических соединений тяжелые металлы не поддаются биологической деструкции и, таким образом, имеют практически «бесконечную» токсичность для животных и растений [2]. Обладая высокой способностью к биоаккумуляции, тяжелые металлы быстро включаются в пищевые цепи и накапливаются в организмах видов, находящихся на высоких трофических уровнях, включая человека. По этой причине даже невысокое, по сравнению с другими поллютантами, содержание тяжелых металлов делает загрязненные водоемы непригодными для использования в большинстве хозяйственных и бытовых целей. На экосистемном уровне загрязнение тяжелыми металлами проявляется в деградации сообществ, изменении и сокращении числа видов и особей [3]. Одним из результатов таких изменений экосистем является снижение способности водоемов к самоочищению. В связи с вышеизложенным очевидна необходимость проведения постоянного мониторинга содержания тяжелых металлов в водоемах различного назначения. На данный момент наиболее активно развивающимся направлением мониторинга является биологический контроль качества пресных вод, основанный на системах биоиндикации. Методы биоиндикации обладают высокой чувствительностью и информативностью, и на данный момент являются одними из основных методов определения качества поверхностных вод в странах ЕЭС, Великобритании, Австралии, Новой Зеландии, Канады и США [4].

Одной из перспективных групп организмов-индикаторов являются протисты,

¹ Статья представлена доктором биологических наук профессором О.Н. Макуриной.

² Васин Антон Евгеньевич (vanton@samtel.ru), кафедра зоологии, генетики и общей экологии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

в том числе и инфузории. Они играют значительную роль в пищевых цепях. Как консументы II уровня инфузории являются важным звеном переноса энергии на более высокие трофические уровни. Также инфузории играют важную роль в процессах самоочищения водоемов [5]. Высокая чувствительность инфузорий к токсическому действию различных поллютантов позволяет обнаруживать загрязнения на самых ранних стадиях и при незначительных концентрациях. Однако широкому внедрению биоиндикационных систем на основе сообществ простейших препятствует недостаточное исследование некоторых аспектов токсического воздействия тяжелых металлов на инфузорий. Одним из них является вопрос о способности инфузорий адаптироваться к долгосрочному воздействию различных тяжелых металлов в низких концентрациях. Имеющиеся по этому вопросу данные немногочисленны и трудно сравнимы из-за разных методик проведения экспериментов и использования различных характеристик в качестве критериев адаптивного ответа. В большинстве исследований хронического действия тяжелых металлов на инфузорий в качестве критериев влияния металлов рассматриваются индексы видового сходства между контрольными и экспериментальными сообществами [6, 7]. Тем не менее, исследования степени адаптации инфузорий к тяжелым металлам важны, так как высокие адаптивные способности организмов снижают их индикационные возможности, приводя к искажению результатов мониторинга.

Для оценки степени адаптации инфузорий к действию солей тяжелых металлов на примере инфузории *Paramecium multimicronucleatum* нами было исследовано влияние хронического воздействия солей Cd, Ni, Cu и Pb в различных концентрациях, не вызывающих острого токсического действия.

Материалы и методы

Была исследована способность инфузорий адаптироваться к солям Cd, Ni, Cu и Pb в концентрациях 1, 0,1 и 0,01 мг/л при хроническом (15 дней) воздействии. В исследовании использовалась моноклональная линия инфузорий *P. Multimicronucleatum*, выделенная из проб, взятых в Саратовском водохранилище в районе поселка Малая Рязань (территория национального парка Самарская Лука). Инфузории содержались в органической среде на основе дрожжевого отвара [8] по методике полунепрерывного культивирования с ежедневной заменой части среды [9] при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$. В качестве культиваторов использовались стеклянные колбы объемом 100 мл. В растворы тяжелые металлы вносились в виде нитратов $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Маточные растворы солей готовились на дистиллированной воде, рабочие растворы готовились путем серий последовательных разведений.

В колбы со средой объемом 90 мл, не содержащей солей металлов, вносилось 10 мл культуры инфузорий. Культиваторы помещались в термостат, через 72 часа после начала культивирования в экспериментальные культиваторы вносились соли тяжелых металлов в рабочей концентрации. Для исследования дейст-

вия каждой концентрации эксперимент проводился в 3 повторах, контрольный эксперимент проводился в 6 повторах. Критерием действия металлов и степени адаптации к ним инфузорий служила плотность культуры, определявшаяся каждые 24 часа. Для этого культура в колбе тщательно перемешивалась, после чего проводился отбор 10 проб объемом 1 мл каждая. Пробы фиксировались насыщенным раствором нитрата ртути $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, подсчет клеток проводился под бинокулярным микроскопом МБС-10.

При статистической обработке полученных результатов для парного сравнения показателей выборок использовался U-критерий Манна-Уитни. Множественные сравнения между выборками проводились с помощью критерия Крускала-Уоллиса с последующей оценкой различий методом Дана [10]. Различия между выборками считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что в концентрации 1 мг/л соли Cd, Ni и Cu вызывают полную гибель культуры инфузорий на ранней стадии эксперимента. В среде, содержащей медь и кадмий, гибель культуры произошла на 4 день. В среде, содержащей никель, гибель наступила на 3 день. Свинец в исследуемой концентрации не вызвал гибели культуры, однако произошло статистически значимое снижение ее плотности по сравнению с контролем. На основе анализа динамики плотности культуры с 3 дня эксперимента нами сделан вывод об отсутствии признаков адаптации культуры к токсичному действию свинца в исследуемой концентрации.

При концентрации солей металлов 0,1 мг/л (рис. 2) соли Ni, Cu и Cd показали более высокую токсичность для инфузорий, чем нитрат свинца. Гибель культуры инфузорий под действием нитрата никеля наступила на 3 день, под действием нитрата меди и нитрата кадмия на 6 и 9 день. Концентрация клеток в культуре для всех металлов через 24 часа после начала эксперимента статистически значимо отличалась от контроля. Для культуры, подвергавшейся действию свинца, наблюдалось статистически значимое снижение плотности культуры с 6 по 10 день эксперимента. Однако с 10 по 15 день произошел рост плотности культуры до уровня наблюдаемого в начале эксперимента, что, по-нашему мнению, является признаком адаптации культуры к действию соли свинца в данной концентрации.

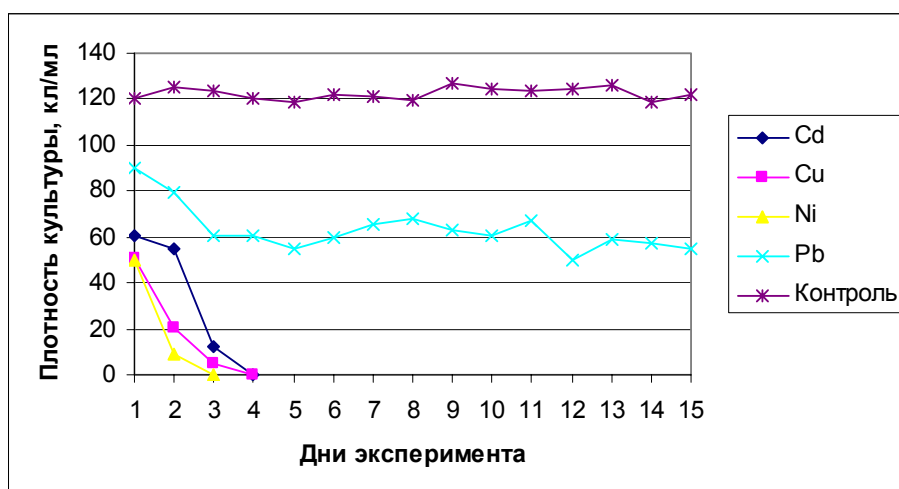


Рис. 1. Динамика плотности культуры инфузорий при воздействии солей тяжелых металлов в концентрации 1 мг/л

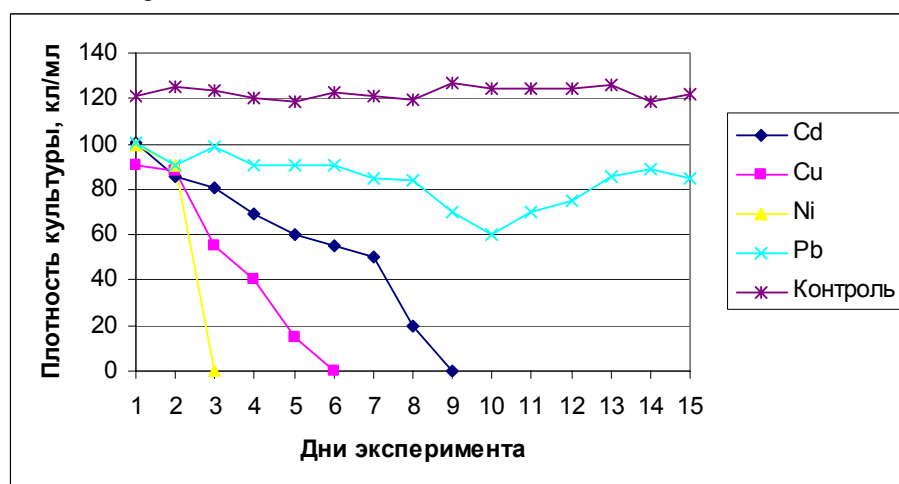


Рис. 2. Динамика плотности культуры инфузорий при воздействии солей тяжелых металлов в концентрации 0,1 мг/л

При воздействии солей металлов в концентрации 0,01 мг/л (рис. 3) статистически значимое снижение плотности культуры наблюдалось под действием нитратов кадмия, никеля и меди. Отличие динамики плотности культуры под действием нитрата свинца статистически незначимо отличалось от контроля.

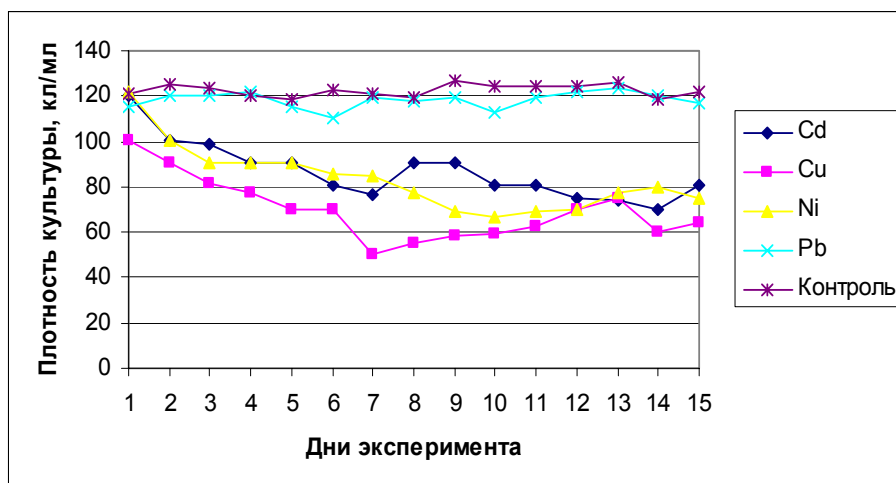


Рис. 3. Динамика плотности культуры инфузорий при воздействии солей тяжелых металлов в концентрации 0,01 мг/л

Обсуждение

Несмотря на многочисленные исследования, тонкие механизмы токсичности тяжелых металлов до сих пор не раскрыты. Однако показано, что одним из результатов их воздействия на клетки является повреждение ферментов, вызванное нарушением их нативной конформации. Характерной реакцией организмов на воздействие тяжелых металлов на клеточном уровне является синтез коротких пептидов-металлотионинов [11]. Такой ответ характерен и для позвоночных и беспозвоночных животных, включая инфузорий, что позволяет говорить о неспецифичности ответа. В состав металлотионинов входит аминокислота цистеин, которая благодаря своему строению проявляет высокое сродство к ионам тяжелых металлов и может сорбировать от 7 до 12 атомов металлов, тем самым придавая металлотионином протектирующие свойства, позволяя снижать степень повреждения ферментных систем [12-14]. По-видимому, данный механизм лежит в основе физиологической адаптации организмов к действию тяжелых металлов. Однако начало активного синтеза таких пептидов требует времени и затрат энергии. Можно предположить, что такой механизм эффективен только при определенных (пороговых) концентрациях тяжелых металлов, так как при достижении определенной концентрации ионы металлов нарушают структуру и функционирование ферментных систем и тем самым делают невозможным или неэффективным запуск механизмов синтеза металлотионинов. Из этого можно сделать вывод, что способность организмов к адаптации зависит не только от типа металла, но и от концентрации, в которой он действует на организм. На примере действия солей Ni, Cu и Cd на инфузорий *P. multimicronucleatum* можно сделать предположение, что концентрации, при которых возможна адаптация клеток к их действию, находятся в диапазоне концентраций меньших, чем ис-

следованных в эксперименте.

Анализ динамики плотности культуры инфузорий в эксперименте с нитратом свинца в концентрации 1 мг/л и 0,1 мг/л показывает, что различие в плотности культур в промежутке с 7 по 11 день эксперимента статистически не значимо. Однако если при концентрации нитрата свинца 1 мг/л наблюдается дальнейшее падение плотности культуры, то при концентрации 0,1 мг/л наблюдался ее рост до уровня плотности 1 дня эксперимента. Можно предположить, что на данный период приходится момент запуска физиологического ответа на действие металла, однако он оказывается эффективным только при определенной концентрации соли свинца в среде, а сама адаптация носит физиологический характер и не затрагивает генетических механизмов. Для проверки этого предположения часть культуры, адаптированной к действию нитрата свинца, была нами перенесена на чистую среду, в которой культивировалась в течение 21 дня, после чего на ней был проведен повторный эксперимент по изучению действия нитрата свинца на плотность культуры. Различия в результатах оказались статистически незначимыми, что говорит о физиологической, а не генетической адаптации инфузорий к действию металла.

Выводы

1. Концентрация нитратов Ni, Cu и Cd, при которых возможна адаптация инфузорий *P. multimicronucleatum* к действию ионов этих металлов, лежит в диапазоне, меньшем 0,01 мг/л.
2. Адаптация инфузорий *P. multimicronucleatum* к нитрату свинца происходит при концентрации 0,1 мг/л и носит не наследственный характер.

Литература

- [1] Lars, J. Hazards of heavy metal contamination / J. Lars // British Medical Bulletin. – 2003. – V. 68. – № 1. – P. 167-182.
- [2] Мартин, Р. Бионеорганическая химия токсичных ионов металлов / Р. Мартин; пер. с англ.; под ред. Х. Зигеля, А. Зигель // Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. – М.: Мир, 1993. – С. 25-62.
- [3] Эйхенбергер, Э. Взаимосвязь между необходимостью и токсичностью металлов в водных экосистемах / Э. Эйхенбергер; пер. с англ.; под ред. Х. Зигеля, А. Зигель // Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. – М.: Мир, 1993. – С. 63-87.
- [4] Семенченко, В.П. Принципы и системы биоиндикации текущих вод / В.П. Семченко. – Минск: Орех, 2004. – 125 с.
- [5] Мамаева, Н.В. Инфузории бассейна р. Волги. Экологический очерк / Н.В. Мамаева. – Л.: Наука, 1979. – 150 с.
- [6] Алекперов, И.Х. Токсическое влияние некоторых тяжелых металлов на модельные сообщества инфузорий Каспия / И.Х. Алекперов // Инфузории в био-

- тестировании: тез. док. межд. заоч. науч.-практ. конф. / Архив ветеринарных наук. – СПб.; 1998. – С. 66-67.
- [7] Олексив, И.Т. Эколого-токсикологические закономерности формирования и развития сообществ планктонных инфузорий в токсической среде / И.Т. Олексив // Инфузории в биотестировании: тез. док. межд. заоч. науч.-практ. конф. // Архив ветеринарных наук. – СПб, 1998. – С. 109-110.
- [8] Сазонова, В.Е. Использование биотестов при разработке мониторинга водной экосистемы / В.Е. Сазонова, Л.А. Зализняк, Л.М. Савельева // Экология. – 1997. – № 3. – С. 207-212.
- [9] Кокова, В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / В.Е. Кокова. – Новосибирск: Наука, 1982. – 168 с.
- [10] Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с. англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
- [11] Cytosolic binding of Cd, Zn, and Ni in four polychaete species / K.D.H. Eriksen [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. – 1990. – V. 95. – No. 1. – P. 111-115.
- [12] Klaasen, C. Metallothionein: an intracellular protein a protect against cadmium toxicity / C. Klaasen, J. Liu, S. Choudhuri // An. Rev. of Pharm. and Tox. – 1999. – V. 39. – P. 267-294.
- [13] Kagi, J.H.R. Biochemistry of Metallothionein / J.H.R. Kagi // Biochem. 1988. – V. 27. – P. 8509-8515.
- [14] Biochemical and ultrastructural data on *Tetrahymena pyriformis* treated with copper and cadmium / Piccinni E. [et al.] // Journ. of Cell Science. – 1987. – V. 88. – P. 283-293.

Поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 4/X/2006.

ADAPTATION OF PARAMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM (*CILIATA*) TO HEAVY METAL SALTS³

© 2006 А.Е. Vasin⁴

Adaptation capability of *Paramecium multimicronucleatum* to Cd, Ni, Cu and Pb salts in chronic experiment is studied.

Paper received 25/IX/2006.
Paper accepted 4/X/2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Makurina.

⁴ Vasin Anton Evgenievich (vanton@samtel.ru), Dept. of Zoology, Genetics and General Ecology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.