

УДК 574.64:57.017.3

ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ ИНФУЗОРИЙ РОДА *PARAMECIUM*¹

© 2007 А.Е. Васин²

Исследована токсичность солей тяжелых металлов Cd, Ni и Pb для инфузорий рода *Paramecium* (*P. ciliatum*, *P. aurelia* complex).

Введение

Одной из наиболее опасных групп токсикантов попадающих в пресные водоемы с промышленными и бытовыми отходами являются тяжелые металлы. Их высокая опасность для экосистем и здоровья человека была неоднократно показана во многих работах [1]. В связи с этим очевидна необходимость проведения постоянного мониторинга содержания тяжелых металлов в водоемах, особенно в зонах сброса неконтролируемых по составу отходов – участков в черте городов и промышленных зон, водоемов биоочистки бытовых стоков и т.д. Одним из эффективных методов мониторинга содержания тяжелых металлов в водоемах является биомониторинг, основанный на методах биоиндикации. В основе большинства применяющихся на данный момент систем биоиндикации с использованием водных беспозвоночных лежит концепция эталонного створа [2]. Согласно этой концепции степень изменения качества воды (содержание тяжелых металлов) оценивают по разнице состояния биоиндикационной группы организмов на контролируемом участке водоема и эталонном участке – не подвергающемся воздействию сбросов. Однако одним из условий применения этого подхода является сохранение естественного состояния контролируемого участка, так как значительное антропогенное изменение водоема (изменение береговой линии, рельефа, типа грунта) приводит к нарушению естественной структуры сообщества водных беспозвоночных на всех уровнях, и делает невозможным адекватное сравнение с метриками эталонных участков. Однако часто участки водоемов, на которых необходимо проводить мониторинг не отвечают этому требованию, так как подверглись значительной антропогенной трансформации. Для преодоления этого ограничения были предложены методы биоиндикации основанные на использовании организмов биомаркеров [3, 4]. Эти методы лишены ограничений

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

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

связанных с соответствием условий метрик контролируемого и эталонного участков, так как критерием оценки загрязненности тяжелыми металлами в них служат не структурные изменения сообществ, а реакции вида биомаркера на организменном, клеточном или биохимическом уровне. Одной из перспективных групп организмов биомаркеров являются свободноживущие инфузории. Благодаря особенностям своего строения они позволяют одновременно регистрировать показатели на клеточном и организменном уровне. Высокая чувствительность к ксенобиотикам позволяет определять загрязнения на самых ранних стадиях и с высокой степенью точности. Однако на данный момент вопросы чувствительности инфузорий к тяжелым металлам изучены недостаточно, как и критерии и методики выбора видов индикаторов. Большинство имеющихся в литературе данных относятся к исследованиям сверхострой и острой токсичности металлов в краткосрочных экспериментах. Полученные в этих работах результаты не дают данных необходимых при выборе видов биомаркеров.

В проведенном исследовании была оценена чувствительность инфузорий разных клональных линий двух видов (*Paramecium caudatum* и *Paramecium aurelia* complex) к токсичному действию солей Cd, Ni и Pb в различных концентрациях при 24 часовой экспозиции.

Материалы и методы

Была исследована чувствительность инфузорий *P. caudatum* и *P. aurelia* complex к солям Cd, Ni и Pb в концентрациях 10, 1, 0,1 и 0,01 мг/л при 24 часовой экспозиции. Исследования проводились на моноклональных линиях инфузорий, 3 линиях *P. aurelia* complex выделенных из проб взятых в Саратовском водохранилище и 2 линиях вида *P. caudatum* выделенных из проб взятых в Саратовском и Куйбышевском водохранилищах. Инфузории содержались на органической среде, на основе дрожжевого отвара [8], по методике полу-непрерывного культивирования с ежедневной заменой части среды [9], при температуре 22 ± 1 °C. В качестве культиваторов использовались стеклянные колбы объемом 300 и 500 мл.

В растворы тяжелые металлы вносились в виде нитратов $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Маточные растворы солей готовились на дистиллированной воде, рабочие растворы приготавливались путем серий последовательных разведений.

Инфузории отмывались в чистой среде и с помощью микропипетки по 10 штук помещались в лунки планшета для культуры тканей с минимальным количеством отмывочной среды. Затем с помощью сэмплера в лунки вносилось по 1,8 мл среды и 0,2 мл маточного раствора солей металлов для получения концентрации согласно схеме эксперимента. Каждый опыт для соли металла в каждой концентрации проводился в 5 повторах. Во время эксперимента инфузорий не кормили. Планшеты помещались в термостат на 24 часа, при температуре 22 ± 1 °C.

Критерием токсичности служила гибель инфузорий. Подсчет выживших клеток проводился с помощью бинокулярного микроскопа МБС -10. Неподвижные и изменившие форму клетки считались погибшими.

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 [7]. Различия между выборками считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Из представленных на рис. 1 и рис. 2 данных видно, что чувствительность инфузорий *P. aurelia* complex всех трех линий к солям Cd и Ni лежит в диапазонах от 0,01 до 10 мг/л. В концентрации 10 мг/л соли этих металлов вызывают 100% гибель клеток инфузорий, а в концентрации 0,01 мг/л при 24 часовой экспозиции гибели клеток не наблюдается. Для инфузорий *P. aurelia* complex линии 1 разница в чувствительности к Cd и Ni при концентрации 1 мг/л оказалась статистически значимой. У инфузорий линии 3 чувствительность к токсичному действию металлов оказалась ниже, чем у линий 1 и 2. Статистический анализ показал значимость этих различий.

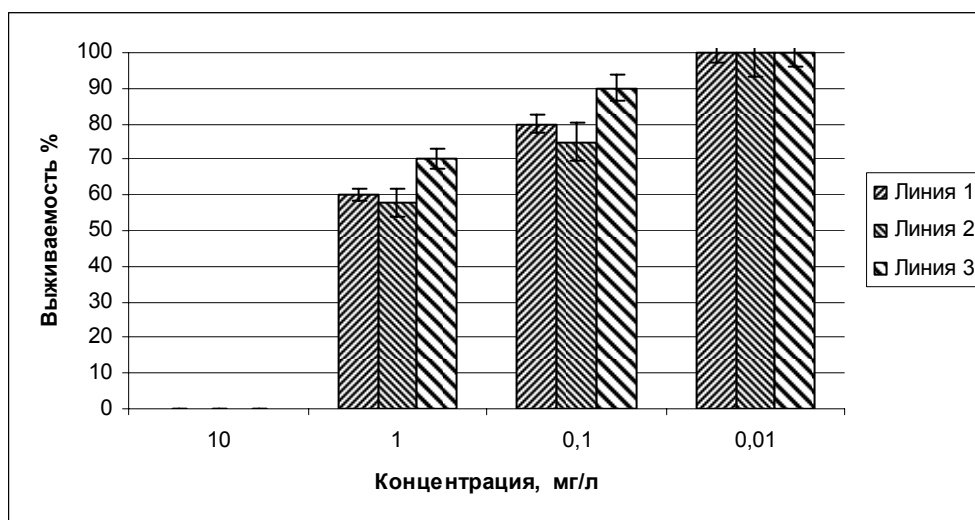


Рис. 1. Выживаемость клональных линий инфузорий *P. aurelia* complex при воздействии Cd в различных концентрациях

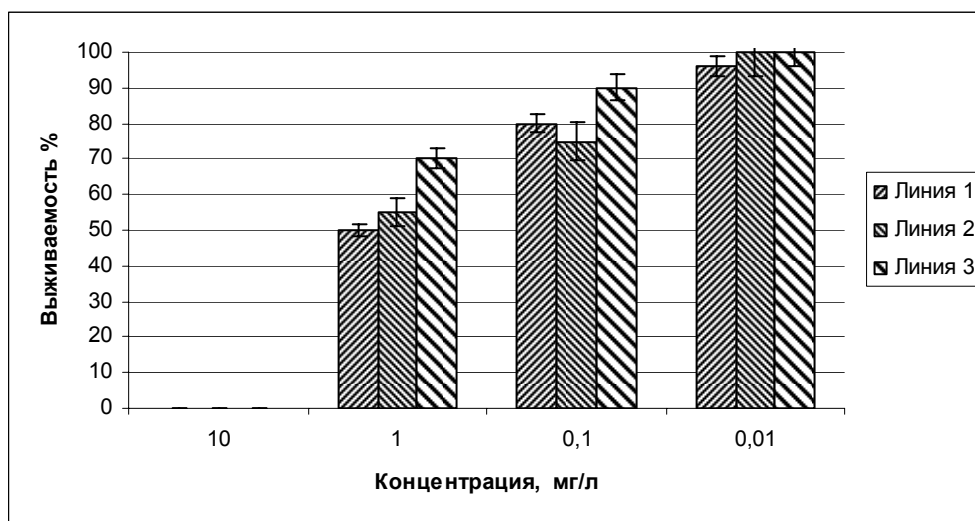


Рис. 2. Выживаемость клональных линий инфузорий *P. aurelia* complex при воздействии Ni в различных концентрациях

Для линии 1 ряд токсичности металлов представлен последовательностью Ni>Cd>Pb. Для линий 2 и 3 ряд токсичности выстаривается как Cd≥Ni>Pb. Из данных представленных на рис. 3 видно, что чувствительность инфузорий *P. aurelia* complex исследуемых линий к солям Pb ниже, чем к солям Cd и Ni. Разница в чувствительности к токсичному действию соли Pb между инфузориями различных линий оказалась статистически незначимой. Из полученных результатов видно, что концентрация солей Pb вызывающая 100% смертность инфузорий имеет значение большее 10 мг/мл.

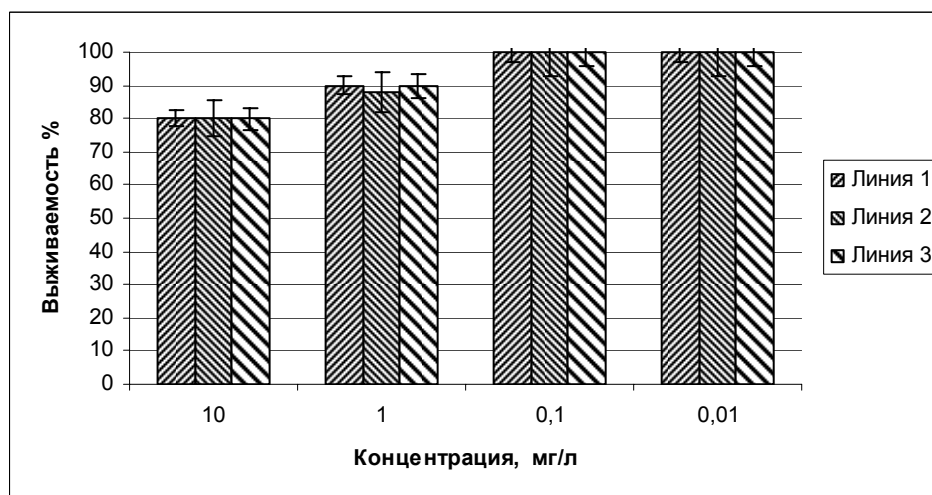


Рис. 3. Выживаемость клональных линий инфузорий *P. aurelia* complex при воздействии Pb в различных концентрациях

Как видно из данных представленных на рис. 4, рис. 5 и рис. 6 для исследуемых линий инфузорий *P. caudatum* диапазон токсичного действия солей Cd, Ni и Pb оказался сходным с таковым у инфузорий *P. aurelia* complex. Однако в отличие от *P. aurelia* complex различие в чувствительности к ионам металлов между исследуемыми линиями *P. caudatum* оказалось статистически незначимым. Для обеих клональных линий ряд токсичности металлов выстраивается в виде $Cd=Ni>Pb$. Для всех линий исследуемых видов токсичность растворов солей металлов растет с увеличением концентрации.

Межвидовое сравнение чувствительности показало, что чувствительность линии 3 инфузорий *P. aurelia* complex к Cd и Ni ниже чем у линий *P. caudatum*, а у линии 2 *P. aurelia* complex выше чем у линий *P. caudatum*. Различия между видами в чувствительности к Pb статистически незначимы.

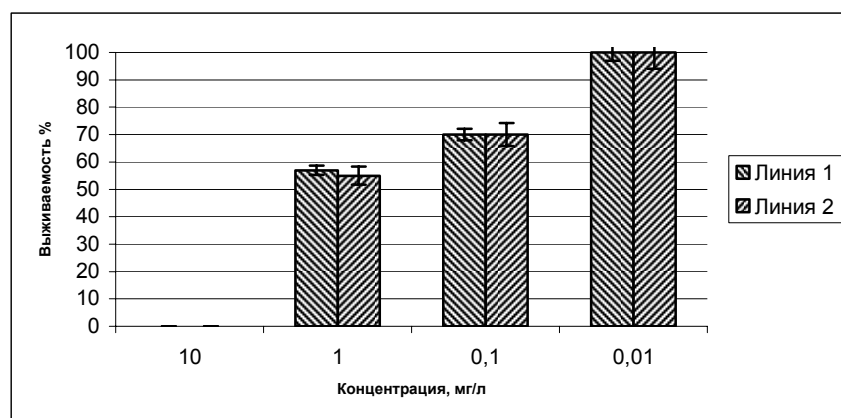


Рис. 4. Выживаемость клональных линий инфузорий *P. caudatum* при воздействии Cd в различных концентрациях

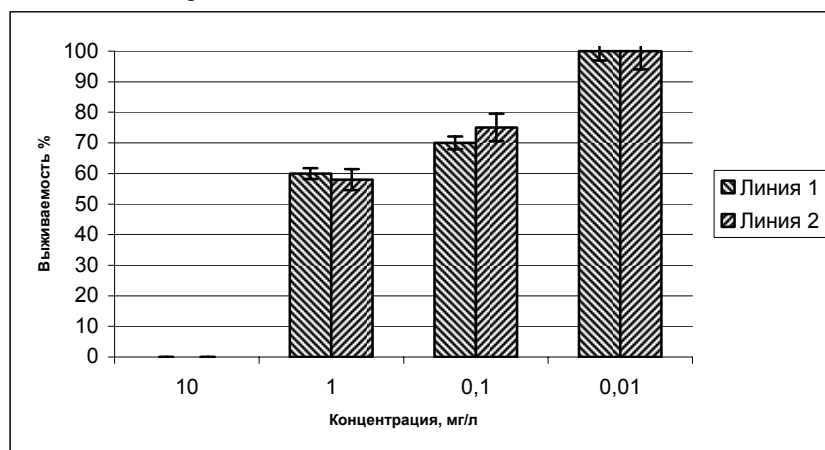


Рис. 5. Выживаемость клональных линий инфузорий *P. caudatum* при воздействии Ni в различных концентрациях

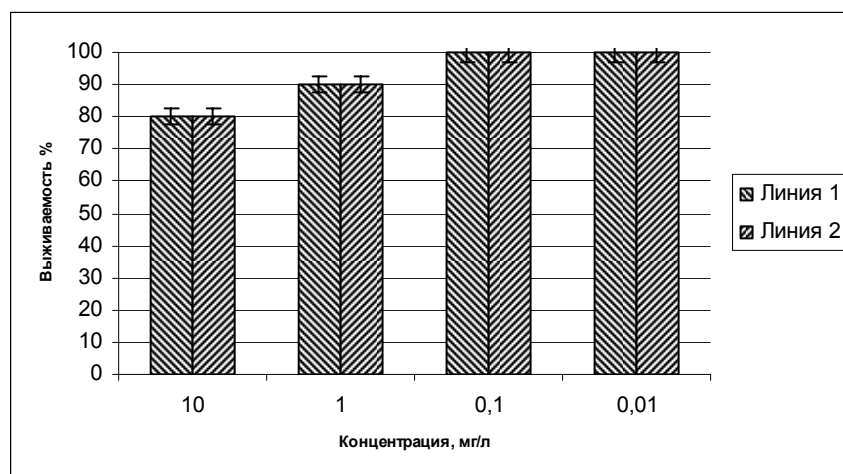


Рис. 6. Выживаемость клональных линий инфузорий *P. caudatum* при воздействии Pb в различных концентрациях

Обсуждение

На данный момент диапазоны чувствительности различных видов инфузорий к токсичному действию тяжелых металлов исследованы явно недостаточно. Имеющиеся по этому вопросу работы немногочисленны, а полученные в них результаты трудно сравнимы между собой из-за разных методик проведения наблюдений и использования разных критериев токсичности [8]. Кроме того, методические затруднения вызывает выбор видов для проведения подобных исследований, так как большинство массовых видов, представляющих интерес в качестве организмов –биомаркеров и биоиндикаторов имеют незначительные линейные размеры, трудны в культивировании и систематическом определении. Инфузории рода *Paramecium* не являясь массовыми видами [9] широко распространены в природе, и встречаются в большинстве водоемов. Достаточно легкое систематическое определение до рода, и простое культивирование позволяет рассматривать их как перспективные виды-индикаторы. В литературе имеются данные об исследованиях действия Ni на инфузорий этого рода [10-11], из которых следует, что разница в чувствительности между разными видами рода – *P. bursaria* и *P. putrinum* может различаться в четыре раза. Полученные нами данные также говорят о различии чувствительности между двумя исследованными видами, однако уровень различий не столь велик. Полученные нами ряды токсичности металлов для инфузорий соответствуют литературным данным [8]. Можно предположить, что с незначительными изменениями они верны для большинства видов инфузорий. Такое распределение металлов в ряду токсичности можно объяснить специфичностью их действия на биохимические процессы в организме инфузорий. Известно, что токсичный эффект Cd и Ni в первую очередь проявляется в инактивации ферментов, причем процесс носит не избирательный характер. В результате этого происходит нарушение биохимических процессов клетки на всех уров-

нях. Одним из эффектов действия этих металлов даже в небольшой концентрации является необратимое угнетение активности митохондрий, эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи [12]. Для одноклеточного организма развитие этого процесса означает немедленную гибель, так как в отличие от многоклеточных организмов тканевая компенсация невозможна. Этим объясняется высокая чувствительность инфузорий к этим металлам. Кроме того, и Ni и Cd являются сравнительно новыми элементами для биосферы, так как рост их содержания в окружающей среде связан в первую очередь с деятельностью человека. Этим можно объяснить отсутствие механизмов специфической защиты к этим металлам у организмов. Свинец также выступает ингибитором ферментов, однако его активность значительно ниже, чем у Cd и Ni. Благодаря более низкой скорости инактивации ферментов в клетке возможны процессы биохимической адаптации, что также повышает устойчивость инфузорий к действию Pb.

Наличие статистически достоверных различий в чувствительности к тяжелым металлам между линиями инфузорий *P. aurelia* complex можно объяснить следующим образом. По современным данным морфологический вид *P. aurelia* является комплексом 15 видов двойников различающихся только на биохимическом уровне [13], причем часть видов является космополитами, и имеют широкое распространение. Полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о том, что исследуемые линии морфологического вида *P. aurelia* принадлежат к разным сингенам или видам.

Выводы

1. В диапазоне исследованных концентраций для линий инфузорий *P. aurelia* complex показано статистически значимое различие в чувствительности к Ni и Cd между различными линиями.
2. Из-за сложности точного видового определения и широкого варьирования уровня чувствительности к тяжелым металлам инфузории морфологического вида *P. aurelia* complex мало пригодны для использования в качестве видов биомаркеров.
3. В диапазоне исследованных концентраций инфузории *P. caudatum* обладают высокой чувствительностью к Cd и Ni, и низкой к Pb, разница в чувствительности между клональными линиями выделенными из Саратовского и Куйбышевского водохранилищ статистически незначима.

Литература

- [1] Lars, J. Hazards of heavy metal contamination / J. Lars // British Medical Bulletin. – 2003. – V. 68. – № 1. – P. 167-182.
- [2] Семенченко, В.П. Принципы и системы биоиндикации текучих вод / В.П. Семенченко. – Минск: Орех, 2004. – 125 с.
- [3] LeBlanc, G.A. Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers / G.A. LeBlanc, L.J. Bain // Environmental Health Perspectives. – 1997. – V. 105. – Sup. 1. – P. 65-80.

- [4] Toxicological foundations of ecological risk assessment: biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species / R.L. Dickerson [et. al.] // Environmental Health Perspectives. – 1994. – V. 102. – Sup. 12. – P. 65-69.
- [5] 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.
- [6] Кокова, В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / В.Е. Кокова – Новосибирск: Наука, 1982. – 168 с.
- [7] Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с. англ.- М.: Практика, 1998. – 459 с.
- [8] Madoni, P. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists / P. Madoni, M. G. Romeo // Environmental Pollution. – 2006. – V. 141 – P. 1-7.
- [9] Мамаева, Н.В. Инфузории бассейна р. Волги. Экологический очерк / Н. В. Мамаева. – Л.: Наука, 1979. – 150 с.
- [10] Madoni, P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates / P. Madoni // Environmental Pollution. – 2000. – V. 109. – P. 53-59.
- [11] Acute Toxicity of Lead, Chromium, and Other Heavy Metals to Ciliates from Activated Sludge Plants / P. Madoni [at al.] // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1994. – V. 53. – P. 420-425.
- [12] Webb, M. The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium / M. Webb // North-Holland Biomedical Press. – Elsevier. – 1979. – P. 141-173.
- [13] Przybo, E. Data on the occurrence of species of the *Parameciumaurelia* complex world-wide / E. Przybo, S. Fokin // Protistology. – 2000. – № 1 (4). – P. 179–184.

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

TOXICITY OF SOME HEAVY METALS TOWARDS FRESHWATER CILIATED *PARAMECIUM*³

© 2007 A.E. Vasin⁴

The acute toxicity of three heavy metals (Cd, Ni, Pb) to freshwater ciliates (*Paramecium caudatum*, *Paramecium aurelia* complex) was examined in laboratory tests.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

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

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