

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 581.192.546

ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИАЛИЗНОЙ КУЛЬТУРЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

И. А. Фомина¹, Я. В. Саванина², Е. Л. Барский², Е. С. Лобакова²

¹ *Департамент Федеральной службы по надзору в сфере природопользования
по Центральному федеральному округу
Россия, 117105, Москва, Варшавское шоссе, 39а*

² *Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1
E-mail: irinafomina.net@mail.ru*

Поступила в редакцию 16.09.17 г.

Оценка загрязненности водной среды с использованием диализной культуры цианобактерий. – Фомина И. А., Саванина Я. В., Барский Е. Л., Лобакова Е. С. – Предложен подход, позволяющий проводить мониторинг загрязнений водотоков путем регистрации изменений пространственно-временных параметров клеток и их внешних структур посредством ИК-спектроскопии внутреннего отражения с использованием диализных культур цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301.

Ключевые слова: цианобактерии, диализное культивирование, водная токсикология, биотестирование, ИК-спектроскопия внутреннего отражения.

Pollution assessment of the aquatic environment with the use of dialysis cyanobacteria cultures. – Fomina I. A., Savanina Ya. V., Barsky E. L., and Lobakova E. S. – An approach to allow monitoring contamination of watercourses by registering changes in the space-time parameters of cells and their external structures by ATR-IR spectroscopy with the use of dialysis cultures of *Synechococcus* sp. PCC 6301 is offered.

Key words: cyanobacteria, dialysis cultivation, aquatic toxicology, biodetection, ATR-IR.

DOI: 10.18500/1684-7318-2017-4-426-429

Водотоки (реки, ручьи, каналы) представляют собой объекты, характеризующиеся высокой степенью пространственной и временной неоднородности как по гидролого-гидрохимическим характеристикам, так и по гидробиологическим параметрам. Для токсикологического контроля сред с неопределенным или сложным составом, включая сточные и загрязненные природные воды, в последние десятилетия часто используется понятие «биотестирование». К числу преимуществ биотестирования относятся оперативность и чувствительность (Филенко, Михеева, 2007).

Авторами статьи разработан вариант методики экспресс-контроля качества водной среды в природных водоёмах (включая водотоки) путем регистрации изме-

нений пространственно-временных параметров клеток и их внешних структур с использованием ИК-спектроскопии внутреннего отражения диализных культур фототрофных микроорганизмов.

В качестве тест-объекта для токсикологических опытов использовали 9 – 11-суточную культуру одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301 (далее в тексте *Synechococcus* 6301), инкубируемую в мешках фирмы «Serva» (Германия) как описано ранее (Лебедева и др., 2010; Барский и др., 2015).

Состояние клеток цианобактерии-биоиндикатора оценивали по величине разности дихроичных соотношений полос поглощения белков целых клеток цианобактерий и их внешних структур (ΔP) при использовании метода спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне. Уменьшение величины ΔP , как было показано для ряда микроорганизмов, коррелирует со снижением их физиологической активности (Калабеков, Королев, 2000; Фомина и др., 2016).

Статистический анализ проводили в 2 этапа. На первом этапе была проверена гипотеза о нормальности распределения ΔP для каждой из выборок. Если распределение исходных данных было отлично от нормального, использовали методы дисперсионного анализа (Analysis of Variance, ANOVA) и непараметрические критерии Kruskal – Wallis test, Brown – Mood test. За величину статистической значимости принимали $\alpha = 0.05$ (Мятлев и др., 2009).

В качестве тест-объекта была выбрана чистая культура свободноживущей одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* 6301. Особенности морфологического строения, высокая скорость размножения, чувствительность к неблагоприятным факторам среды делают этот микроорганизм удобным объектом для биотестирования. Тест-объект способен выявлять интегральный биологический эффект комплекса неблагоприятных экологических факторов (Филенко, Михеева, 2007).

Для контроля загрязнения природного водотока *in situ* необходима иммобилизация клеток тест-культуры на носителе. Одной из разновидностей иммобилизованных культур является диффузионное (иначе – диализное) культивирование, при котором клетки культуры отделены от внешнего объема среды мембраной с размерами пор, пропускающих соединения с определенной молекулярной массой. Особенности метода максимально проявляются при высоком соотношении поверхности и объема диализной мембраны: наиболее подходящая форма диализного мешка – удлиненный цилиндр, полностью погруженный в 5 – 10-кратный объем «внешней среды» (Барский и др., 2015; Лебедева и др., 2010). В относительно небольшом объеме диализного мешка накапливается высокой плотности популяция «физиологически молодых», чувствительных к внешним воздействиям клеток, свободному прохождению молекул токсикантов диализная мембрана не препятствует. Культуру в диализном мешке легко перемещать из одной среды в другую, при этом клетки в диализном мешке остаются в стерильных условиях. Это позволяет как обеспечивать истощение клеточных резервов при одновременном удалении продуктов автоингибирования, так и изучать физиологические изменения культур в любых загрязненных средах, как *in vitro*, так и *in vivo*, включая возможность воспроизводить в лаборатории условия, характерные для загрязнений естественных водоёмов, например, моделируя разовый или неоднократный сброс путем замены внешней среды (Лебедева и др., 2010).

Исследование посредством ИК-спектроскопии внутреннего отражения изменений содержания в клетках тест-объекта важнейших биополимеров, их пространственного распределения и структурной организации показало, что наиболее существенные различия между клетками в разных функциональных состояниях, а также между целой клеткой и ее поверхностными структурами (их толщина составляет примерно 0.1 диаметра клетки) были обнаружены в спектральной области 1660 см^{-1} и 1550 см^{-1} , характерной для белковых компонентов. Разность дихроичных отношений полос поглощения белков целых клеток и их внешних структур (ΔP) была выбрана в качестве спектрального показателя, способного характеризовать общее состояние популяции клеток объекта в зависимости от условий культивирования (Калабеков, Королев, 2000).

Возможность получать однородный материал для токсикологических исследований выявлена при изучении роста *Synechococcus* 6301 в периодическом суспензионном и диализном режимах культивирования. При переходе диализной культуры в стационарную фазу роста (9 – 11 сут.) более 90% популяции представлено «молодыми» клетками, которые сохраняют чувствительность к внешним воздействиям и физиологическую активность. При отсутствии внешних воздействий величина ΔP за период измерений (2 – 5 сут.) практически не изменяется, рост культуры, а также изменения таких интегральных параметров среды культивирования, как окислительно-восстановительный потенциал и pH, незначительны (Барский и др., 2015).

Установлено, что выбранный показатель ΔP зависит главным образом от уровня загрязнения водной среды. Использование методов статистического анализа позволяет уменьшить влияние неоднородностей условий, при которых проводятся отдельные наблюдения, и получить достоверный результат при минимальном количестве исследуемых проб (Мятлев и др., 2009).

Влияние на показатель ΔP таких факторов, как начальная концентрация клеток тест-культуры, время инкубации культуры на загрязненной среде, объем исследуемой среды и вид загрязнителей (органических или минеральных), незначительно, по крайней мере, в заданных интервалах условий (Фомина и др., 2016).

Предложенный метод оценки состояния популяции фотосинтезирующих микроорганизмов по величине ΔP пригоден для определения качества воды в лабораторных исследованиях и в условиях *in situ* при экологическом мониторинге, как это показано при обследовании двух пунктов на р. Москва, заведомо отличающихся по уровню загрязненности (Барский и др., 2015; Фомина и др., 2016).

Показатель ΔP отражает токсикологическое воздействие загрязняющих веществ, влияние общего гидрохимического режима, а также изменений температуры и освещенности. Так, в речном протоке *in situ* в августе и, особенно, в сентябре показатель ΔP заметно ниже по сравнению с его значением, полученным в июле. Возможно, это связано с замедлением обменных процессов у микроорганизмов в связи с сезонным снижением температуры и освещенности в водоёме. При этом разница ΔP , которая отражает уровень загрязненности водной среды между точками отбора проб, сохраняется (Фомина и др., 2016).

ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Прямой зависимости между высокими значениями показателя ΔP и интенсивным нарастанием биомассы фитопланктона исследуемых водотоков не обнаружено, а соотношение видов в фитопланктоне зависит от уровня загрязнения среды (Саванина и др., 2017).

Показатель ΔP может быть эффективно использован при оценке загрязнений водной среды и для тех фототрофных микроорганизмов, которые отличаются от *Synechococcus* 6301 по размерам, строению клетки, организации внешних структур, а также по физиологии (Барский и др., 2015).

Как нам представляется, разработанный подход позволяет по-новому строить стратегию охраны водных объектов и обоснованно выбирать уровень снижения поступления загрязняющих веществ, выявлять неорганизованные (аварийные, не-санкционированные) источники сброса.

Работа выполнена при поддержке НИР «Физико-химические основы молекулярной биоинженерии» (№ АААА-А16-116021660024-7) Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (биологический факультет).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барский Е. Л., Саванина Я. В., Фомина И. А., Лобакова Е. С. Оценка качества водной среды с использованием цианобактерий // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии : материалы XXIV междунар. конф. М. : Изд-во «Новые информационные технологии», 2015. С. 224 – 233.

Калабеков А. Л., Королев Ю. Н. Экологический мониторинг : некоторые методы неинвазивного анализа интактных клеток. М. : Прима-Пресс, 2000. 179 с.

Лебедева А. Ф., Барский Е. Л., Саванина Я. В., Королева С. Ю., Королев Ю. Н., Лобакова Е. С. Диализное культивирование микроорганизмов как адекватная модель контроля популяции при исследовании экосистем // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология. 2010. № 2. С. 15 – 20.

Мятлев В. Д., Панченко Л. А., Ризниченко Г. Ю., Терехин А. Т. Теория вероятностей и математическая статистика. Математические модели : университетский учебник. М. : Академия, 2009. 315 с.

Саванина Я. В., Барский Е. Л., Фомина И. А., Лобакова Е. С. Биотестирование с использованием спектроскопии внутреннего отражения и биоиндикация // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии : материалы XXVI междунар. конф. М. : Новые информационные технологии, 2017. С. 105 – 114.

Филенко О. Ф., Михеева И. В. Основы водной токсикологии. М. : Колос, 2007. 144 с.

Фомина И. А., Саванина Я. В., Барский Е. Л., Панченко Л. А., Лобакова Е. С. Метод ИК-спектроскопии внутреннего отражения клеток цианобактерий и их внешних структур для оценки уровня загрязнения водотоков // Проблемы региональной экологии. 2016. № 6. С. 18 – 22.