

УДК 574.6, 574.522

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА РОСТА КУЛЬТУР
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ВИДОВ *MONORAPHIDIUM ARCUATUM*
(KORSCH.) HIND. И *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* (TURP.)
BRÉB.**

Н.Е. Спиркина, В.И. Ипатова, А.Г. Дмитриева, О.Ф. Филенко

В лабораторных условиях исследован рост культуры нового для практики биотестирования вида микроводорослей *Monoraphidium arcuatum* (Chlorococcales). Рост и изменения в структуре популяции *M. arcuatum* происходили сходно с видом *Scenedesmus quadricauda*, который широко используется как тест-объект в оценке качества водной среды. Установлено, что за счет образования большего количества автоспор при меньшем количестве делящихся клеток на протяжении всего эксперимента общая численность клеток в культурах *M. arcuatum* была выше, чем у *S. quadricauda*, что позволяет более оперативно получать свидетельства влияния факторов окружающей среды. С учетом этого культура *M. arcuatum* может быть рекомендована для исследований с целью дальнейшего использования в качестве тест-объекта в контроле качества среды.

Ключевые слова: культуры микроводорослей, *Scenedesmus quadricauda*, *Monoraphidium arcuatum*, скорость роста, структура популяции, биотестирование.

С каждым годом возрастает влияние антропогенной нагрузки на водные экосистемы, что требует постоянного совершенствования методов биотестирования. Для наиболее адекватной оценки степени опасности загрязнения для водных организмов тест-объекты должны быть представительными для своего трофического уровня, чувствительными к токсическим веществам, доступными и удобными для проведения биотестирования, а кроме того, они должны быть специально подготовлены в лабораторных условиях (Крайнюкова, 2009).

При оценке качества водной среды в мировой практике широко применяются микроводоросли, которые благодаря высокой скорости размножения и относительной простоте культивирования являются удобным объектом для экспериментальных исследований. Чаще других используются представители хлорококковых водорослей: *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum*, *Pseudokirchneriella subcapitata* и некоторые другие (ISO-8692, 1989; Hsieh et al., 2006; OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006). Вид *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. рекомендован для использования в качестве тест-объекта при проведении стандартной процедуры биотестирования в РФ (Методические рекомендации..., 1986; Методическое руководство..., 1991; Жмур, Орлова, 2001; ГОСТ Р 54496-2011, 2011). На протяжении многих лет на

кафедре гидробиологии биологического факультета МГУ проводилось всестороннее изучение культуры данного вида при разных воздействиях с контролем параметров роста и состояния клеток (морфология, размеры, флюоресценция хлорофилла и др.) (Дмитриева, 1988; Артюхова и др., 2000; Прохоцкая, 2000), а также оценкой физиологической гетерогенности популяции, проводимой с помощью метода микрокультур (Филенко и др., 2004; Марушкина, 2005; Дмитриева и др., 2012). Закономерности развития, установленные для культуры *S. quadricauda*, несмотря на наличие некоторых видовых особенностей, являются универсальными для большинства хлорококковых водорослей.

В настоящее время мы проводим работы по изучению вида *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind., который является родственным для большинства используемых в биотестировании водорослей и обладает сходными с ними морфологическими и экологическими признаками. В имеющейся литературе мы не встретили информации о применении *M. arcuatum* как тест-объекта для оценки качества природной или сточной воды и грунта, а также данных о динамике развития и физиологическом состоянии культуры в длительном эксперименте. Такие сведения могли бы служить основой для дальнейших исследований по внедрению *M. arcuatum* в практику биотестирования.

Цель нашей работы состояла в исследовании особенностей развития и структурных изменений в популяциях *M. arcuatum* в длительных экспериментах. Мы провели также сравнение этих характеристик с аналогичными параметрами культур *S. quadricauda* с перспективой дальнейшего использования *M. arcuatum* для биотестирования.

Материалы и методы

M. arcuatum – одиночная водоросль с дуговидно изогнутыми клетками (осевая длина 26–60 мкм, ширина 0,8–4,4 мкм, расстояние между концами 20–50 мкм), распространена в пресных водоемах Южного и Северного полушария, является важным звеном в пищевых цепях. *M. arcuatum* размножается бесполо, образуя внутри материнской клетки 4–8 автоспор, которые выходят при разрыве ее оболочки (Царенко, 1990). Альгологически чистую культуру данного вида получали с помощью метода, описанного в книге В.М. Андреевой (1998). Для этого суспензию водорослевых клеток из пресноводного аквариума разбавляли питательной средой Успенского № 1 (Успенская, 1966) до получения концентрации не более 1000 клеток в 1 мл. Разбавленную суспензию в объеме 0,1 мл вносили в чашки Петри на поверхность агаризованной питательной среды и равномерно распределяли стерильным шпателем. Закрытые чашки Петри помещали в люминистат до появления видимых невооруженным глазом колоний. Далее стерильной иглой отбирали клетки *M. arcuatum* и переносили в жидкую питательную среду Успенского № 1. Видовую принадлежность определяли с помощью определителя П.М. Царенко (Царенко, 1990). Исследование роста культуры начали через пять месяцев после предварительного культивирования с учетом периода адаптации к лабораторным условиям.

S. quadricauda – ценобиальная хлорококковая водоросль, состоящая из удлиненно-цилиндрических клеток размером (8–36)×(2,1–12) мкм. При размножении в материнской клетке образуются 2–4 автоспоры, которые слагаются в молодую колонию (Царенко, 1990). В природных условиях ценобии *S. quadricauda* обычно состоят из 4, 8 или 16 клеток, в то время как при культивировании в лаборатории на синтетических питательных средах связи между клетками ослабевают и чаще образуются 2–4-клеточные ценобии и одноклеточные формы (Nakamura, 1963). Изменение числа клеток в ценобиях или переход к существованию в виде одноклеточных форм происходит по мере развития культуры в зависимо-

сти от фазы роста и плотности клеточной суспензии (Swale, 1967).

Культуры обоих видов выращивали на среде Успенского № 1, рекомендованной для вод средней загрязненности органическими веществами с соблюдением стандартных условий в люминистате при досвечивании лампами дневного света (12:12 ч) и температуре 22±2°C (Методическое руководство ..., 1991). Для опыта отбирали нормально развивавшиеся культуры водорослей, однократно синхронизированные в темноте в течение 1–3 сут (Успенская, 1966), находившиеся на начальной стадии логарифмического роста (до 10 сут) и содержавшие не менее 95% живых клеток (определение живых клеток осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа «Carl Zeiss Axioscop 2 FS Plus»). Испытания проводили в конических колбах с 50 мл среды и в пенициллиновых пузырьках с 10 мл среды одновременно на культурах обоих видов в трехкратной повторности для каждой емкости. Численность клеток определяли в камере Горяева под световым микроскопом. Учитывали изменение численности клеток, структуру популяции и скорость прироста клеток в культурах.

Изменения в структурном составе популяций оценивали с помощью метода микрокультур, который адекватно отражает процессы изменения численности, происходящие в макрокультуре (Филенко и др., 2004). Для этого из культур водорослей (макрокультуры) отбирали единичные клетки или ценобии, которые помещали в несколько камер Горяева для формирования микрокультур, чтобы исходная выборка составляла 30–80 клеток. Наблюдения проводили в течение трех суток. Структуру популяции в микрокультурах оценивали по изменению соотношения размножившихся (давших потомство), покоящихся (не давших потомство в процессе наблюдения) и отмерших (погибших в процессе наблюдения или изначально мертвых) клеток.

Показателем скорости прироста численности клеток в популяции было количество клеточных делений в сутки (v), которое рассчитывали по формуле (Шлегель, 1987):

$$v = (\ln N_{(t+\Delta t)} - \ln N_t) / (\Delta t \times \ln 2),$$

где:

N_t – численность клеток в культуре в момент времени t ,

$N_{(t+\Delta t)}$ – численность клеток в культуре в момент времени $(t+\Delta t)$,

Δt – период изменения численности.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с «Методикой определения токсичности вод, ...» (Жмур, Орлова, 2001) в программе Excel-2003, доверительный интервал рассчитывали для уровня значимости 0,05.

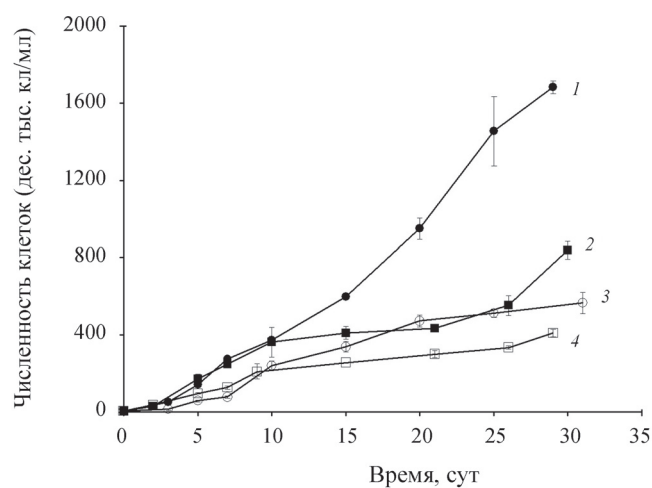
Результаты и обсуждение

В процессе роста культур обоих видов водорослей численность клеток в колбах и в пенициллиновых пузырьках различалась.

В культуре *S. quadricauda* существенных различий численности в разных емкостях отмечено не было вплоть до 10 сут (рисунок, кривые 3, 4). Однако позже численность в пенициллиновых пузырьках стала превышать таковую в колбах и на 30-е сутки эксперимента была уже в 1,3 раза выше.

Максимальная скорость прироста *S. quadricauda* была отмечена в первые 5 сут при культивировании в обоих типах емкостей. Далее она снижалась, причем до 15 сут снижение скорости прироста численности было более быстрым в колбах, где происходило в 1,5–2,0 раза меньше клеточных делений, чем в пенициллиновых пузырьках (табл. 1).

Рост *M. arcuatum* в колбах проходил сходно с ростом *S. quadricauda* в пенициллиновых пузырьках (рисунок, кривые 2, 3). Различия в изменении численности клеток *M. arcuatum* при выращивании в обоих типах емкостей проявлялись подобно изменениям в культуре *S. quadricauda*: после 10 сут численность в пенициллиновых пузырьках интенсивно возрастала и на 30-е сутки вдвое превышала численность клеток в культуре, выращенной в колбах.



Изменение общей численности клеток в культурах *Monoraphidium arcuatum* (1, 2) и *Scenedesmus quadricauda* (3, 4) при выращивании в пенициллиновых пузырьках (1, 3) и в колбах (2, 4) в марте–апреле 2012 г.

Наиболее быстрый прирост численности *M. arcuatum* в колбах и в пенициллиновых пузырьках также наблюдался в первые 5 сут и был в среднем в 1,3 раза интенсивнее, чем прирост *S. quadricauda* в этот же период в соответствующих емкостях (табл. 1). После 5 сут эксперимента темп деления *M. arcuatum* замедлялся и до 10 сут был близким к таковому у *S. quadricauda*.

Снижение скорости прироста обоих видов водорослей происходило достаточно интенсивно до 15 сут и было более значительным в колбах, чем в пенициллиновых пузырьках, а после 15 сут продолжалось с небольшими колебаниями и было более равномерным в пенициллиновых пузырьках, но не приводило к снижению общей численности (табл. 1, рисунок).

Преобладание численности клеток *M. arcuatum* над таковой у *S. quadricauda* при близких значениях числа клеточных делений может быть связано с образованием большего количества автоспор при делении *M. arcuatum*. Тот факт, что численность клеток обеих культур при выращивании в пенициллиновых пузырьках была выше, чем в колбах, отмечался нами ранее. Скорее всего это можно объяснить разной удельной поверхностью этих емкостей: наши расчеты показали, что у пенициллиновых пузырьков она в 2,2 раза выше, чем у конических колб. При более высоком отношении площади поверхности сосуда к его объему обеспечивается лучшее освещение столба жидкости с клетками водорослей.

Структурный состав популяций обоих видов в пенициллиновых пузырьках оценивали методом микрокультур на 1–4-е, 8–11-е, 17–20-е сутки и дополнительно на 22–25-е сутки для *S. quadricauda*.

По данным, полученным с помощью этого метода, в начальный период (1–4-е сутки) популяция *S. quadricauda* на 55% состояла из размножившихся клеток, в сутки происходило около 0,22 клеточных делений (табл. 2). Наиболее активное деление клеток в микрокультуре *S. quadricauda* проходило с 8-е по 11-е сутки эксперимента (0,42 делений/сут), при этом в структуре популяции преобладали размножившиеся клетки (до 80%), скорость деления которых увеличилась почти вдвое. Поэтому в макрокультуре численность клеток в этот период была высокой. После 15 сут, по мере снижения доли размножившихся клеток до 35% (за счет их перехода в состояние покоя), темп деления замедлялся и был близок к темпу деления в 1–4-е сутки роста микрокультуры (табл. 2).

В структурном составе популяции *M. arcuatum* в течение всего срока наблюдения преобладала фрак-

Таблица 1

Количество клеточных делений в сутки (ν) в культурах *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при выращивании в емкостях разного объема в марте-апреле 2012 г.

Культура	Емкость	Количество клеточных делений при продолжительности эксперимента (сут)					
		0–5	5–10	10–15	15–20	20–25	25–30
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Колбы	0,83±0,06	0,23±0,04	0,06±0,04	0,04±0,03	0,03±0,02	0,07±0,02
	Пенициллиновые пузырьки	0,71±0,08	0,41±0,05	0,10±0,05	0,09±0,04	0,02±0,01	0,03±0,02
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	Колбы	1,02±0,07	0,21±0,08	0,04±0,02	0,02±0,01	0,06±0,04	0,12±0,04
	Пенициллиновые пузырьки	0,97±0,05	0,27±0,02	0,14±0,02	0,13±0,03	0,12±0,05	0,04±0,02

Таблица 2

Структурный состав (%) и количество клеточных делений в сутки (ν) в популяциях *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* по данным, полученным с помощью метода микрокультур

Культура	Фракция клеток	Продолжительность эксперимента (сут)			
		1–4	8–11	17–20	22–25
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	покоящиеся	43	18	60	65
	размножившиеся	55	80	35	32
	отмершие	2	2	3	3
	ν	0,22	0,42	0,23	0,17
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	покоящиеся	67	56	65	–
	размножившиеся	30	40	27	–
	отмершие	3	4	8	–
	ν	0,42	0,43	0,43	–

ция «покоящихся», т.е. не разделившихся в процессе наблюдения клеток (до 65% к 20 сут), в то время как у *S. quadricauda* преобладание покоящихся клеток наблюдалось только при выходе культуры на стационарную фазу роста. Доля размножившихся клеток у *M. arcuatum* была наиболее высокой в фазе логарифмического роста макрокультуры (40%), а по мере приближения стационарной фазы число размножившихся клеток в микрокультуре снизилась до 27%. Доля отмерших клеток колебалась незначительно в процессе роста микрокультур обоих видов. Скорость прироста численности клеток в микрокультурах *M. arcuatum* оставалась практически постоянной в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, в периоды 1–4-е и 17–20-е сутки скорость прироста клеток в микрокультурах *M. arcuatum* была вдвое выше, чем у *S. quadricauda* в эти же сроки. Несмотря на то что у *S. quadricauda* в периоды 1–4-е и 8–11-е сутки преобладали размножившиеся клетки, и их содержание почти вдвое превышало таковое в культуре *M. arcuatum*, рост микрокультур

S. quadricauda в целом проходил менее активно (табл. 2). Хотя доля размножившихся клеток в микрокультуре *M. arcuatum* даже в период самого активного роста не превышала 40% (против 80% у *S. quadricauda*), численность клеток в макрокультуре этого вида всегда была выше, чем у *S. quadricauda* за счет образования клетками *M. arcuatum* большего количества автоспор (4–8 против 2–4 у *S. quadricauda*). В процессе наблюдения за микрокультурами было установлено, что большинство клеток *M. arcuatum* (53–84%) образовывали по 4 автоспоры, и только в период 17–20-е сутки преобладали клетки, дававшие по 8 автоспор (68%). На основании этого можно заключить, что в «нормальном» состоянии культуры клетки *M. arcuatum* образуют при делении 4 автоспоры, а образование 8 автоспор является, по-видимому, компенсаторным механизмом в условиях снижения числа делящихся клеток при «старении» культуры, а также может иметь место при наступлении неблагоприятных условий (изменение температуры, освещенности, воздействие токсикантов или экзометаболитов и др.).

В литературе сообщается о влиянии загрязнения природных вод на изменение морфологии ценобиев у видов рода *Scenedesmus* (Trainor et al., 1976). Так, при повышенном уровне эвтрофикации водоема доминировали ценобии, а в воде, загрязненной промышленными стоками, преобладали одноклеточные формы. Сокращение числа клеток в ценобиях и появление одноклеточных форм у *Scenedesmus* может быть связано не только с ослаблением связей между клетками, но и с формированием меньшего количества автоспор, что может являться диагностическим признаком также и при определении состояния культуры *M. arcuatum*.

Таким образом, на основании проведенных исследований существенных различий в росте и структуре популяций микроводорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda* не выявлено. Развитие обеих культур в длительном эксперименте в целом происходило близко к классической логистической кривой как в колбах, так и в пенициллиновых пузырьках.

Более высокая численность *M. arcuatum* по сравнению со *S. quadricauda* была обусловлена способностью *M. arcuatum* к образованию большего количества автоспор (до 8 на отдельных этапах) и более высокому темпу деления клеток в начальный период. Значительное увеличение численности клеток про-

исходило в пенициллиновых пузырьках, что могло быть связано с их большей удельной поверхностью по сравнению с колбами. Благодаря быстрому росту ответ тест-культуры на интоксикацию можно получить в более короткие сроки.

В популяциях *M. arcuatum* на протяжении исследованных периодов роста делилось меньше клеток, чем у *S. quadricauda*, а основная часть популяции была представлена покоящимися клетками. Пул покоящихся клеток, которые не участвовали в делении, составляет резерв популяции для восстановления численности при неблагоприятных условиях среды. Как было установлено нами ранее, культура *M. arcuatum* обладает высокой чувствительностью к эталонному токсиканту бихромату калия, сопоставимой с чувствительностью *S. quadricauda* (Спиркина, 2012).

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что культура вида *M. arcuatum*, который является типичным продуцентом и широко распространен в пресных водоемах обоих полушарий, в связи с высокой скоростью роста на средах, характерных для водоемов средней степени загрязнения органическими веществами, и чувствительностью к эталонному токсиканту может быть перспективной для использования в качестве тест-объекта в практике биотестирования окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб., 1998. 351 с.
- Артюхова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Чжао И. Функциональные изменения, происходящие в лабораторной популяции микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. при различных режимах токсического воздействия // Вестн. Моск. ун-та. 2000. Сер. 16. Биология. № 2. С. 52–59.
- ГОСТ Р 54496-2011: Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. М., 2011. 58 с.
- Дмитриева А.Г. Метод биотестирования по определению живых и мертвых клеток водорослей с помощью люминесцентной микроскопии // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 85–89.
- Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Ипатов В.И. Метод микрокультур в исследовании структуры популяции // Альгология: тез. докл. конф. «Актуальные проблемы современной альгологии», 23–25 мая 2012 г. Киев, 2012. С. 98–99.
- Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. М., 2001. 48 с.
- Крайнюкова А.Н. Система интегральной токсикологической оценки природных и сточных вод // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2009. Т. 1. № 4 (37). С. 30–33.
- Марушкина Е.В. Исследование состояния популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* в норме и при интоксикации методом микрокультур // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. 21 с.
- Методические рекомендации по установлению предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных водоемов. М., 1986. 88 с.
- Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90. М., 1991. 48 с.
- Прохоцкая В.Ю. Структурно-функциональные характеристики популяции *Scenedesmus quadricauda* при интоксикации // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2000. 22 с.
- Спиркина Н.Е. Использование хлорококковой водоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korshikov) Hindak в биотестировании // Альгология: тез. докл. конф. «Актуальные проблемы современной альгологии», 23–25 мая 2012 г. Киев, 2012. С. 278–279.
- Успенская В.И. Экология и физиология питания пресноводных водорослей. М., 1966. 124 с.
- Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Исследование структуры модельной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* методом раздельного культивирования клеток // Сб. мат-лов междунар. науч.-

- практ. конф. МГУ-СУНИ «Человечество и окружающая среда», 26–28 октября 2004 г. М., 2004. С. 190–193.
- Царенко П.М. Краткий определитель Хлорококковых водорослей Украинской ССР. Киев, 1990. 198 с.
- Шлегель Г. Общая микробиология. М, 1987. 566 с.
- Hsieh S.H., Tsai K.P., Chen C.Y. The combined toxic effects of nonpolar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata* // Water Res. 2006. Vol. 40. N 10. P. 1957–1964.
- ISO-8692: Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. Geneva, 1989.
- Nakamura H. Biological knowledges on species of *Chlorella* and *Scenedesmus*. Tokyo: Kyoritsu Women's University, 1963. 43 p.
- OECD Guidelines for the testing of chemicals Freshwater («Algae and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test»). Paris, 2006. 25 p.
- Swale E.M.F. A clone of *Scenedesmus* with Chodatella-stages // Brit. Phycol. Bull. 1967. Vol. 3. N 2. P. 281–293.
- Trainor F.R., Cain J.R., Shubert L.E. Morphology and nutrition of the colonial green algae *Scenedesmus*: 80 years later // Bot. Rev. 1976. Vol. 42. N 1. P. 5–25.

Поступила в редакцию 12.09.13

**COMPARATIVE GROWTH OF MICROALGAE CULTURES OF SPECIES
MONORAPHIDIUM ARCUATUM (KORSCH.) HIND. AND SCENEDESMUS
QUADRICAUDA (TURP.) BRÉB.**

N.E. Spirkina, V.I. Ipatova, A.G. Dmitrieva, O.F. Filenko

The growth of a new for the practice of bioassays culture of microalgae *Monoraphidium arcuatum* (Chlorococcales) was investigated. The growth and changes in the *M. arcuatum* population structure were similar to those in *Scenedesmus quadricauda*, which is widely used as a test - organism to assess the quality of the aquatic environment. It is found that due to the formation of more autospores with fewer dividing cells during the experiment the total number of cells in cultures of *M. arcuatum* was higher than in *S. quadricauda*, enabling more express evidence of the influence of environmental factors. With this culture *M. arcuatum* can be recommended for further studies to be used as a test object in the environment quality control.

Key words: microalgae cultures, *Scenedesmus quadricauda*, *Monoraphidium arcuatum*, growth rate, population structure, bioassay.

Сведения об авторах: Спиркина Наталья Евгеньевна – мл. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ (natus25@list.ru); Ипатова Валентина Ивановна – ст. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ, канд. биол. наук (viipatova@hotmail.com); Дмитриева Аида Георгиевна – вед. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ, канд. биол. наук (aigdai@mail.ru); Филенко Олег Федорович – профессор кафедры генетики биологического факультета МГУ, докт. биол. наук (ofilenko@mail.ru).