

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ФИЗИОЛОГИЯ РОСТА СОЛОНОВОДНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ
*DUNALIELLA SALINA***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки 06.03.01 - Биология

Биологического факультета

Панфиловой Екатерины Андреевны

Научный руководитель

доцент кафедры биохимии и биофизики,

К.б.н., доцент _____ *И.К. Миронova* 13.06.17 И.К. Миронова

Научный консультант

В.н.с. лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН,

д.б.н., доцент _____ *В.А. Богатырев* 14.06.17 В.А. Богатырев

Зав. кафедрой биохимии и биофизики

Д.б.н., профессор _____ *С.А. Коннова* 13.06.2017 С.А. Коннова

Саратов 2017

Введение. Основным методом в водной токсикологии, который способен дать оценку токсичности различных загрязнителей с применением тест-объектов, является биотестирование [1]. Тест-объектами могут служить разные виды микроводорослей. Они, являясь одним из наиболее важных источников органического вещества в водных биогеоценозах, принимают участие в биотическом круговороте и проявляют чувствительность к действию природных и антропогенных загрязнителей [2].

В биотестировании используются различные виды пресноводных и солоноводных микроводорослей. В качестве тест-объектов могут быть использованы достаточно чувствительные к действию токсикантов микроводоросли, которые одновременно являются представительными для своего трофического уровня [3]. Специалисты различных стран включают одноклеточные водоросли в процедуру биотестирования, а проведение токсикологических экспериментов на их основе регламентируется специальными документами [4,5].

При проведении токсикологических исследований в биотестировании, для характеристики отклика тест-объекта на действие токсиканта, обращают внимание на различные критерии. Одним из главных показателей нормального функционирования культур микроводорослей считается выживаемость. Кроме того, к критериям токсичности для подобных организмов относятся: внешние изменения состояния культуры, изменения рН среды, численности клеток, скорости роста культуры, подвижности клеток, содержания фотосинтетических пигментов, интенсивности фотосинтеза и т.д. Данные показатели можно оценивать спектрофотометрическим, флуориметрическим и цитохимическими методами [2].

В связи с потребностью в выборе новых тест-объектов в настоящей работе была исследована зеленая микроводоросль *Dunaliella salina*,

которая является типичным представителем и важным звеном в пищевых цепях гипергалинных водоемах Европы, Азии, Северной и Южной Америки [6]. В связи с вышесказанным, целью настоящей работы являлось исследование динамики роста культур солоноводной микроводоросли *D. salina* в норме и в условиях токсикологического эксперимента.

Реализация цели предполагало решение следующих задач:

1. Оценить числовую концентрацию клеток в культурах *D. salina*, построить зависимость показателя поглощения хлорофилла от данной величины.
2. Исследовать динамику роста культур *D. salina* при различных посевных дозах.
3. Оценить чувствительность роста культур *D. salina* к дихромату калия.

Объектом исследования являлась культура зеленой микроводоросли *D. salina*, которая была получена из коллекции института физиологии растений К.А. Тимирязева.

При проведении токсикологического эксперимента с микроводорослями для экспозиции клеток с поллютантом использовались микропланшетные системы. Использование микропланшетов считается наиболее удобным способом для постановки и проведения эксперимента. Реализация токсикологического теста в микропланшетных системах предполагает ряд преимуществ: уменьшение объема образцов, увеличение числа повторностей, уменьшение риска контаминаций за счет использования одноразовой посуды, снижение времени постановки эксперимента [7].

На всех этапах исследования осуществлялся микроскопический и фотометрический мониторинг физиологического состояния культуры микроводоросли [8]. Визуальную оценку морфологических

характеристик культуры проводили с использованием инвертированного светового микроскопа DMI 3000 (Leica, Германия). Фотометрический контроль состояния культуры осуществляется по оценке скорости роста клеток в течение нескольких первых суток при использовании микропланшетного ридера Spark 10M (TECAN, Австрия).

Бакалаврская работа состоит из трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования), выводов, заключения, списка использованных источников литературы (51 источник).

Основное содержание работы. *D. salina* - дуналиелла солоноводная, обитающая в гипергалинных водоемах, способна выдержать широкую амплитуду экстремальных значений различных абиотических факторов. У данных микроводорослей отсутствует ригидная целлюлозная клеточная стенка, что повышает ее адаптационные возможности [9]. Этот вид чаще всего оказывается автотрофным продуцентом в трофических цепях своего водного биогеоценоза [10]. Высокая скорость роста в культурах и морфофизиологические особенности делают его интересным модельным объектом для исследования механизмов устойчивости к действию различного рода факторов.

Определение хлорофилла спектрофотометрическим методом является одним из самых важных в альгологической токсикологии [8].

D. salina принадлежит к отряду зеленые водоросли. Клеточный хлоропласт содержит хлорофиллы а и b, которые обеспечивают оптические свойства объекта и способность поглощать свет в фиолетовой, голубой, синей и красной частях спектра [11]. Спектрофотометрический метод определения хлорофилла позволяет в кратчайший срок дать оценку численной концентрации клеток *D. salina*.

Были получены измерения высоты пика хлорофилла в красной области спектра при длине волны 680 нм с учетом значений ближайших

локальных минимумов 640 и 740 нм. Определение числовой концентрации клеток в культуре *D. salina* проводили в сериях разведений микроводоросли в 96-луночном планшете.

На рисунке 1 изображен калибровочный график, отражающий зависимость фотометрической оценки содержания хлорофилла *in vivo* в суспензиях культур *D. salina* от оптической оценки количества хлорофилла в экстрактах тех же культур. Полученные данные аппроксимируются линейной функцией $y = ax+b$. Значение R^2 (коэффициента детерминации) показывает долю дисперсии зависимой переменной, которая обусловлена ее взаимосвязью с независимой переменной. Коэффициент детерминации принимает значение 0,99, что означает 99% изменчивости оптического параметра A_{680} обуславливается взаимосвязью с числовой концентрацией клеток микроводоросли *D. salina* (рисунок 1). Построенная линейная регрессионная модель адекватно описывает поведение и изменчивость зависимой переменной.

Для успешного проведения токсикологического эксперимента необходимо подобрать оптимальное значение посевной дозы исходной культуры *D. salina*. Экспериментально доказано, что с увеличением посевной плотности токсическое действие вещества ослабляется, так как уменьшается его концентрация и снижается биодоступность [3].

Была исследована динамика роста культур *D. salina* при следующих значениях посевной плотности: 2×10^6 кл/мл, 10^6 и 5×10^5 кл/мл. Скорость роста изучали в течение 48 часов. Исходя из полученных данных, приведенных в таблице под номером 2, можно сделать вывод о том, что наиболее подходящей посевной дозой, которую можно использовать в токсикологических экспериментах, является 10^6 кл/мл. Данная культура характеризуется равномерным ростом. В течение 48 часов после инокуляции, скорость роста культуры составила не более 1 клеточного деления в сутки.

Стандартная гомогенная культура состоит из хорошо заметных 4 фаз роста: лаг-фазы, экспоненциальной, стационарной и отмирания. У физиологически активной культуры кривая роста характеризуется короткой лаг-фазой и резким переходом в экспоненциальную фазу роста.

Кривая роста культуры *D. salina* с посевной плотностью 10^6 кл/мл похожа на стандартную. У нее хорошо заметна лаг-фаза и фаза экспоненциального роста, а также переход между ними. Кривые роста двух других культур *D. salina* не похожи на стандартные. В культурах с оставшимися инокуляционными дозами (2×10^6 и 5×10^5 кл/мл) трудно распознать границу между фазами и нет стремительного роста как в первом случае.

О влиянии токсиканта (дихромата калия) на культуру *D. salina* судили по изменению содержания хлорофилла в клетках относительно контроля. Дихромат калия начал проявлять токсическое действие с наименьшей концентрации токсиканта (5 мг/л). Содержание хлорофилла понижалось с повышением концентрации $K_2Cr_2O_7$. Уменьшение количества хлорофилла в клетках привело к постепенному снижению роста культуры (рисунок 3).

На рисунке 4 показаны значения эффективности действия дихромата калия всех тестируемых концентраций. Эффективность действия дихромата калия выражается снижением количества хлорофилла относительно контроля. Видно, что с увеличением концентрации $K_2Cr_2O_7$, увеличивалась его эффективность действия на данную культуру. Эффективность действия $K_2Cr_2O_7$ при его значении концентрации 5 мг/л составила 25 %, при 10 мг/л – 72 %, 20 – 85 %, 40 – 82 %, 60 – 80 %, 80 – 84 %, 100 – 90 %. На основании полученных данных была вычислена полуэффективная концентрация $K_2Cr_2O_7$ – $EC_{50,48}$. Были выбраны значение концентрации $K_2Cr_2O_7$, давшее более 50 % эффекта – 10 мг/л, и значение концентрации $K_2Cr_2O_7$, давшее менее 50 % эффекта -

5 мг/л. Таким образом, полуэффективная концентрация бихромата калия для *D. salina* составила $7,5 \pm 0,6$ мг/л.

Таблица 1 - Значения скорости роста для культур *D. salina* с различными посевными дозами при культивировании

Временной интервал, часы	Скорость роста μ , клеточные деления/сутки		
	Посевная доза 2×10^6 кл/мл	Посевная доза 10^6 кл/мл	Посевная доза 5×10^5 кл/мл
0-24	$1,18 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,09$	$2,06 \pm 0,83$
24-48	$0,57 \pm 0,06$	$1,43 \pm 0,08$	$1,37 \pm 0,68$
48	$0,01 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,15$

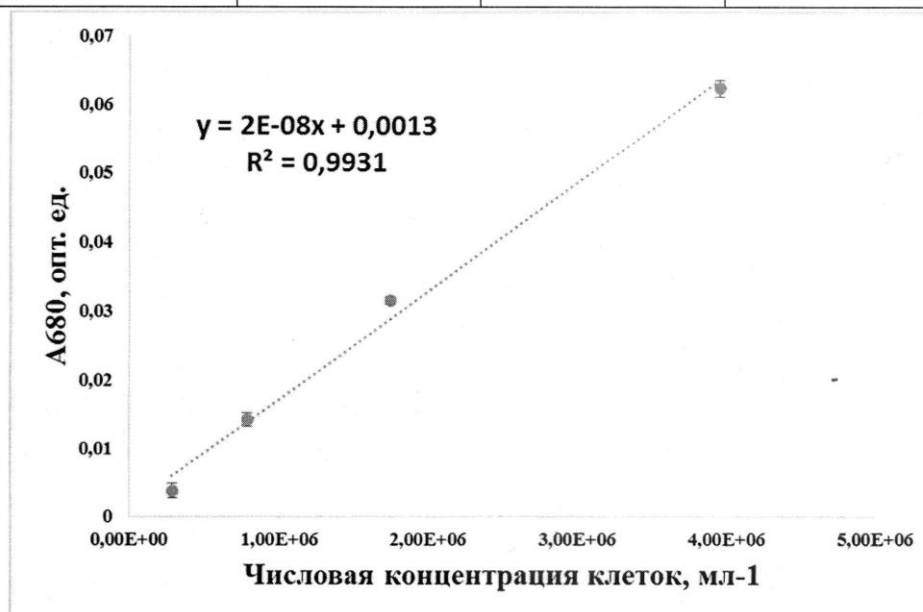


Рисунок 1 - Зависимость показателя поглощения (A_{680}) in vivo от числовой концентрации клеток микроводоросли *D. salina*.

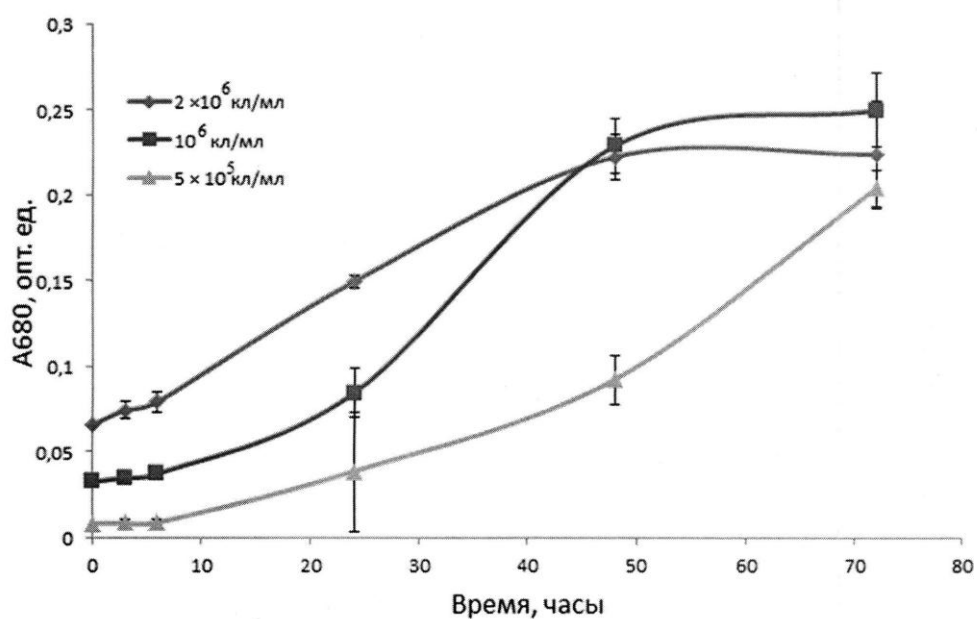


Рисунок 1 - Динамика изменения значения A_{680} во времени при выращивании культур *D. salina* с различными посевными дозами.

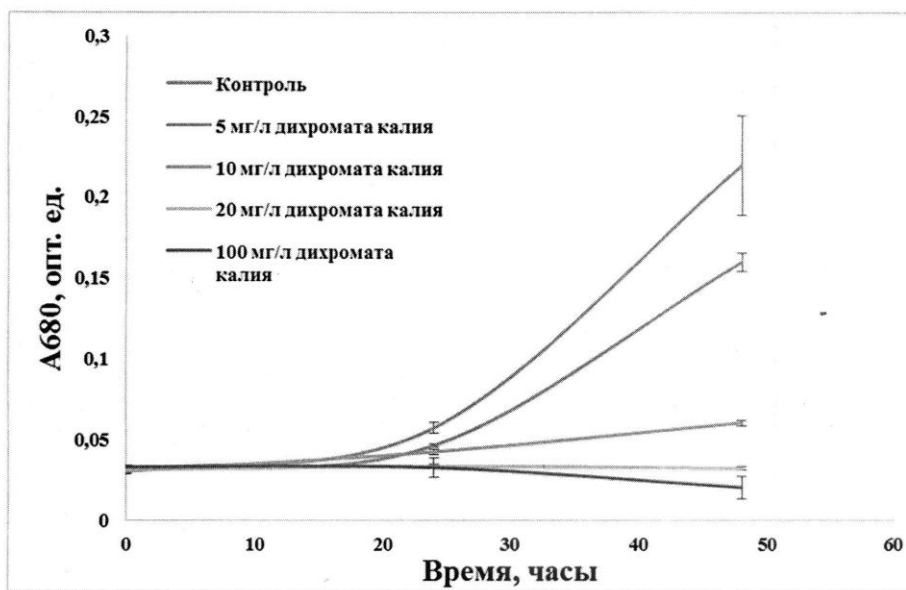


Рисунок 2 - Динамика роста культуры *D. salina* в течение 48 часов с добавлением различных концентраций токсиканта.



Рисунок 3 - Оценка эффективности действия $K_2Cr_2O_7$ на клетки микроводоросли *D. salina* после 48 часов экспозиции.

Заключение. В системе биотестирования микроводоросли можно считать незаменимыми тест-объектами. Благодаря их короткому жизненному циклу, за малый промежуток времени возможно отследить воздействие токсических веществ в ряду поколений, а также оценить последствия действия токсиканта.

В данной работе была исследована динамика роста культур солоноводной микроводоросли *D. salina*, которая является автотрофным продуцентом в трофических цепях своего водного биогеоценоза.

Зависимость показателя поглощения хлорофилла A_{680} в суспензиях культур *D. salina* от числовой концентрации клеток адекватно аппроксимируется линейной функцией, о чем свидетельствует высокое значение коэффициента детерминации: $R^2=0,99$.

Посевная доза порядка 10^6 кл/мл культуры *D. salina*, которая характеризуется равномерным ростом в течение 48 часов после инокуляции, проявляет чувствительность к действию бихромата калия с наименьшей протестированной концентрации токсиканта - 5 мг/л. Рассчитанное значение ЕС5048 бихромата калия для *D. salina* составляет $7,5 \pm 0,6$ мг/л.

В целом, представляется перспективным использование зеленой микроводоросли *D. salina* в системе биотестирования в качестве тест-объекта.

Список использованных источников

1. Филенко, О.Ф. Основы водной токсикологии: учеб. пособие для вузов / О.Ф. Филенко, И.В. Михеева. Москва: Колос, 2007. 144 с.
2. Котелевцев, С.В. Эколого-токсикологический анализ растительных сообществ в водных экосистемах: учеб.-мет. пособие для вузов / С.В. Котелевцев, Д.Н. Маторин, А.П. Садчиков. Москва: Альтекс, 2012. 182 с.
3. Спиркина, Н.Е. Исследование культуры зеленой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* как нового тест-объекта для оценки качества водной среды. дис. ...канд. биол. наук : 03.02.10 / Наталья Евгеньевна Спиркина ; науч. рук. В. И. Ипатова ; Москва. 2016. С. 172.
4. ГОСТ Р 54496-2011. Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. Москва : Стандартинформ, 2012. 54 с.
5. OECD guidelines for the testing chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Test N 201. Paris : 2011. 25 p.
6. Масюк, Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella Teod* / Н.П. Масюк. Киев : Наукова думка, 1973. С. 244.

7. Blaise, C. Small - scale freshwater toxicity investigations / ed. by C. Blaise, J-F. Ferard. Springer, 2005. V. 1. P. 137-159.
8. Использование солонowodной микроводоросли *Dunaliella Salina* как тест-объекта в токсикологических исследованиях: учебно-метод. пособ. / Д. С. Чумаков [и др.]. Саратов, 2017. С. 29
9. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornatum* using microplate and flask bioassay procedures / D. St-Laurent [et. al.] // Environmental toxicology. 1992. V. 7, № 1. P. 35-48
10. Oren, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005 / A. Oren // Saline systems. 2005. V. 1, № 2. 10.1186/1746-1448-1-2.
11. Полевой, В.В. Физиология растений / В. В. Полевой. Москва : Высшая школа, 1989. С. 464.

