

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ИНFUЗОРИЙ К ХИМИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЯМ И ИХ ПРЕОДОЛЕНИЕ ЛЕТАЛЬНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (СПАВ)*

**А.В. Присный,
Ю.Л. Волынкин,
Н.Н. Кампос**

Белгородский
государственный
университет

Россия, 308015, г.Белгород,
ул. Победы, 85

E-mail: prisniy@bsu.edu.ru

В статье приведены результаты изучения повреждающего действия флотореагента РА-14 на клетки инфузорий *in vivo*. Описаны, с приведением иллюстраций, изменение интенсивности и характера движения, инцистирование, разрушение пелликулы, временное и летальное нарушение осморегуляции, повышение вязкости эктоплазмы и образование дополнительных пульсирующих вакуолей. Отмечается резкое повышение осморегуляторной активности при действии сублетальных и летальных концентраций токсиканта. Зарегистрировано явление массового выброса симбиотических зоохлорелл при контакте инфузорий с токсикантом.

Ключевые слова: инфузории, флотореагент РА-14, повреждения, механизмы устойчивости.

Введение

Различные виды инфузорий (*Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838, *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff, 1889, *Stylonychia mytilus* Ehrenberg, 1838) используются в качестве тест-объектов при оценке токсичности веществ и материалов [1, 2, 3, др.]. При постановке тестов на токсичность регистрируются, как правило, гибель/выживаемость, интенсивность движения и изменения внешней формы [4, 5], иногда – изменение интенсивности размножения [1, 6]. Немногочисленные специальные описания действия токсикантов на тест-объекты касаются, прежде всего, изменения размеров и внешней формы инфузорий под действием токсических веществ (пестициды и некоторые другие) [7].

Поверхностно активные вещества (ПАВ), в том числе синтетические (СПАВ), отличаются от большинства токсикантов механизмами действия на клетки, и, соответственно, пороговыми концентрациями, определяющими их опасные для живых тел концентрации, включая ПДК. Они производят явно выраженное разрушительное действие на биологические мембраны или изменяют их проницаемость для воды. Следствием взаимодействия ПАВ с липидным бислоем мембран является или быстрый лизис клетки, или нарушение ее осмотических свойств с конечным результатом, определяемым как концентрацией вещества, так и совершенством организменных эволюционно сложившихся защитных механизмов на клеточном уровне.

Низкие концентрации детергентов (включая СПАВ) действуют подобно ядам и сходны по своему действию на организмы с эффектами, проявляющимися при тепловом загрязнении. В частности, они понижают способность гидробионтов противостоять недостатку кислорода в воде [8].

Устойчивость клеток к действию внешних повреждающих факторов химической природы, при прочих равных условиях, определяется конституцией покровов, отношением площади поверхности к массе, возможно, генетически обусловленными механизмами детоксикации.

Покровы свободноживущих простейших, обладающих собственно животным типом клеток (Protozoa) представляют собой или наружную плазматическую мембрану с гликокаликсом, в той или иной степени покрытую надмембранными образованиями, или пелликулу. Пелликула, в частности, характерна для всех инфузорий и эвгленовых, хотя устройство ее у представителей разных классов и отрядов имеет свои

* Работа выполнена при поддержке гранта БелГУ ВКГ 089-09.



особенности (далее наименования таксонов даны, с учетом адаптированной классификации простейших [9], по К. Хаусман [10] и С.И. Мажейкайте [11]).

Определение значений ПДК растворимых в воде токсикантов на основе DL_{50} , хотя и производится на лабораторных млекопитающих, ориентировано на оценку непосредственной опасности веществ для человека. В тоже время, при попадании в воду, токсиканты, прежде всего, действуют на весь комплекс гидробионтов, в число которых входит и целый ряд традиционных тест-объектов, поддерживаемых в культуре (инфузории, дафнии и др.). Низшие водные организмы, обладая высокой чувствительностью к загрязнению среды их обитания, остаются плохо изученными в плане механизмов устойчивости к повреждающим агентам и характера повреждений клеток синтетическими токсическими веществами.

В процессе изучения влияния нового на российском рынке флотореагента РА-14 (изодецилоксипропиламинацетат), предназначенного для обогащения железной руды, на различные виды гидробионтов нами был накоплен значительный документированный материал, часть которого касается нескольких видов инфузорий, широко распространенных в водоемах Европы.

Материал и методика

Исходный материал выделен из проб воды, отобранной в реках Песочная (окр. г. Железногорска, март 2008 г.), Оскол (старица) (окр. с. Приосколье, апрель 2008 г.) и Везелка (г. Белгород, май 2008 г.). Смешанная культура инфузорий, принадлежащих к родам *Paramecium*, *Stylonichia* и *Euplotes* содержалась в чашках Петри в среде Лозина-Лозинского при периодической подкормке сухими пекарскими дрожжами. Пересев культуры производился ежемесячно.

В опытах по определению степени токсичности различных концентраций флотореагента РА-14 на инфузорий, помимо регистрации уровня смертности тест-объектов через фиксированные промежутки времени, отмечали заметные изменения в состоянии объектов. Затем проводили отдельные специальные непрерывные наблюдения за состоянием инфузорий, находящихся в среде с разной концентрацией реагента, под стереоскопическим микроскопом МСБ-10 с максимальным увеличением 87.5 и под микроскопом Биомед-2, снабженным цифровой фотонасадкой (Sony DSC-W7 с максимальным размером изображения 7.2 мегапикселя), позволяющей произвольно фиксировать наблюдаемые изменения (без иммерсии) в диапазоне оптического увеличения от 100 до 400, а с использованием трёхкратного цифрового увеличения. Наблюдения проводили как в объёмных каплях раствора в пластиковых чашках диаметром 25 мм, так и на предметных стеклах с лунками и без них в каплях покрытых покровным стеклом. Продолжительность непрерывных наблюдений для разных видов при разных концентрациях флотореагента составляла до 180 мин. Опыты проводили при температуре 18–20°C. В каплю (или две, или три) культуры, после обнаружения в ней живых инфузорий добавляли равнозначное количество раствора флотореагента необходимой (удвоенной) концентрации. Отдельную «избранную» инфузорию, удерживали в поле зрения в течение всего периода наблюдения, манипулируя препаратоводителем. При быстром перемещении инфузории уменьшали кратность увеличения микроскопа, не упуская инфузорию из поля зрения. На предметных стеклах поддерживали объем среды, периодически пополняя ее заранее приготовленным раствором соответствующей концентрации.

В опытах использовали следующие виды ресничных инфузорий.

П/кл *Holotrichia*.

Отр. *Hymenostomatida*.

Сем. *Parameciidae*: *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838. Сем. *Frontonidae*: *Colpidium campylum* Stokes, 1886.

П/кл *Spirotrichia*.

Отр. *Heterotrichida*.

Сем. *Stentoridae*: *Stentor polymorphus* O.F. Müller, 1786. Сем. *Spirostomidae*:



Spirostomum ambigum O.F. Müller, 1786; *Blepharisma* sp.

Отр. Hypotrichida.

Сем. Oxytrichidae: *Stylonychia mytilus* Ehrenberg, 1838; *Urostyla weissei* Stein, 1859. Сем. Euplotidae: *Euplotes* sp.

П/кл Peritrichia

Отр. Peritrichida

Сем. Vorticellidae: *Vorticella convallaria* Linne, 1758.

Результаты исследований

Весь объем полученной в экспериментах информации позволяет выделить ключевые элементы в поведении и состоянии инфузорий при внесении в среду исследуемого токсиканта – аминоксодержащего СПАВ флотореагента РА-14.

1. Изменение интенсивности и характера движения. Инцистирование.

Во всех повторностях экспериментов все особи всех исследованных видов инфузорий через несколько секунд после объединения капель среды (с инфузориями) и исследуемого токсиканта реагировали значительным повышением двигательной активности, проявляя четкую реакцию отрицательного хемотаксиса. Через некоторое время движение становилось плохо координируемым и замедленным. В дальнейшем движение или прекращалось совсем (инцистирование или гибель) или восстанавливалось до нормального. Гибель клеток без их разрушения наблюдалась у *P. caudatum* и *S. mytilus* при концентрациях флотореагента 0.0005-0.001 мг/л (рис. 1). При более высоких концентрациях – 0.003-0.02 мг/л – большая или меньшая часть особей этих видов, а также *S. polymorphus* (рис. 2, 3, 7) в течение нескольких минут приобретали сферическую форму и оставались неподвижными от нескольких часов до нескольких дней.

Раздражение. Необычное поведение, вызванное действием реагента (0,01 мг/л) наблюдалось у *S. ambigum*. В течение около 20 минут у этой инфузории несколько раз интенсивное движение сменялось длительным, до 2-3 минут, «замиранием». Затем движение приобрело характер «почесывания»: инфузория в течение почти 2 минут протискивалась вперед и назад сквозь небольшое скопление тесно лежащих песчинок. Несколько позже у этой особи проявились некоторые внутриклеточные изменения (см. п. 4).

2. Разрушение пелликулы.

В растворах реагента с концентрацией 0,2 мг/л и выше у большинства инфузорий сравнительно быстро, от нескольких минут до нескольких десятков минут, происходит везикулизация цитоплазмы и разрушение покровов (*S. mytilus* – рис. 4, 5, *P. bursaria* – рис. 6). Иногда разрушение всей клетки развивается стремительно до полного ее «растворения» (*U. weissei*, рис. 9; *S. mytilus*, рис. 10). Последнее следует учитывать при оценке смертности тест-объектов, когда в пробе обнаруживаются только оставшиеся живые особи. В случае с *U. weissei* отделяющиеся фрагменты клетки с участками пелликулы длительное время (до 4 минут) активно перемещались, а внутренняя часть эндоплазмы распадалась с эффектом «фонтанирования».

3. Временное нарушение осморегуляции (набухание).

Средние концентрации токсиканта (0.003-0.04 мг/л) вызывают нарушение осморегуляции клеток *Blepharisma* sp. (рис. 2), *S. mytilus* (рис. 3), *V. convallaria* (рис. 8), которое выражается в медленном, до нескольких десятков минут, набухании клеток, вплоть до сферической формы. В это время в клетке, находящейся в непрерывном движении, наблюдается интенсивное перемещение, образование и исчезновение различных структур. Иногда набухание клеток, в сочетании с другими их повреждениями (везикулизация цитоплазмы, расслоение пелликулы и др.), завершается гибелью инфузорий (*S. mytilus* – рис. 4, 5, *P. bursaria* – рис. 6), чему может предшествовать разрушение макронуклеуса (рис. 11, 14, 15). В других случаях форма тела и характер движения восстанавливаются, чему иногда предшествует выброс части цитоплазмы через цитостом (*C. campylum* – рис. 11).

4. Повышение вязкости и дифференцировки цитоплазмы

У *P. caudatum* (рис. 14), *V. convallaria* (рис. 8) уже через несколько секунд, а у *S. ambigum* (рис. 12) – примерно через 20 минут, происходит выраженное просветление эктоплазмы с четким обособлением ее от эндоплазмы. Одновременно наблюдается контрастирование цитоплазматических структур и ядра. В случаях необратимого нарушения осморегуляции эктоплазма «выдавливается» сгустками за пределы клетки (*Paramecium* spp., *V. convallaria*) или в промежуток между НПМ и альвеолами (возможно, в полость альвеол), образуя обособленные (предположительно не покрытые мембраной) или поверхностные пузыри.

5. Образование дополнительных пульсирующих вакуолей.

У *P. caudatum* через несколько минут после контакта с флотореагентом наблюдается образование многочисленных дополнительных пузырьков пульсирующих вакуолей (рис. 14, 15). Их появление в разных местах периферического слоя цитоплазмы, медленное наполнение и быстрое освобождение от содержимого позволяют предполагать, что при нарушении осморегуляции внешним воздействием, по крайней мере у *P. caudatum*, альвеолы пелликулы способны выполнять функции центральных пузырьков пульсирующих вакуолей. Известно, что у этого вида альвеолы участвуют в обеспечении конъюгации комплементарных особей [12].

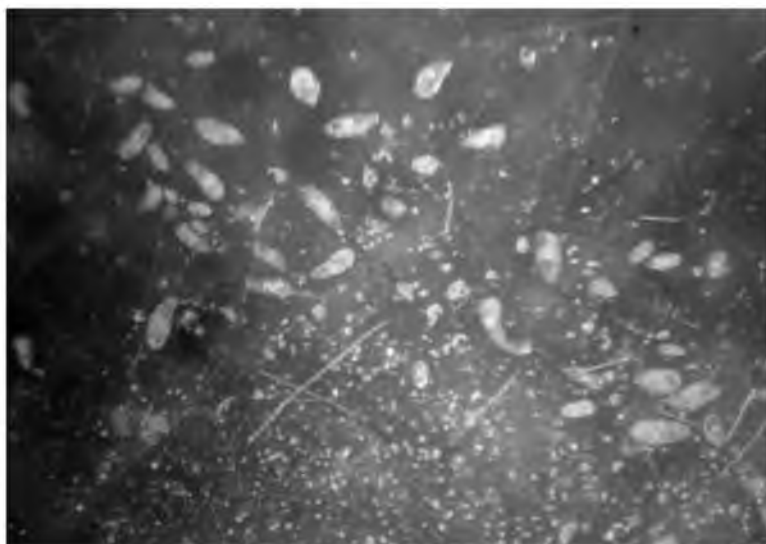


Рис. 1. *P. caudatum*, *S. mytilus* и *Eupotes* sp. – массовая гибель инфузорий в смешанной культуре при низких концентрациях флотореагента РА-14 без разрушения клеток

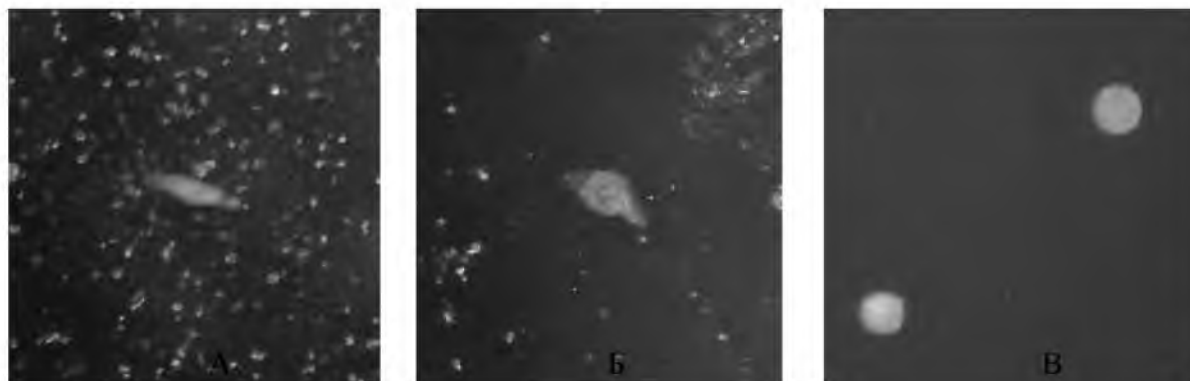


Рис. 2. *Blepharisma* sp. Нормальная форма (А), промежуточная (Б) и конечная (В) стадии набухания клеток при нарушении осморегуляции

6. Поведение симбионтов

Контакт с флотореагентом *P. bursaria* уже через несколько секунд приводит к массовому выбросу из клетки симбиотических водорослей рода *Zoochlorella*, которые после непродолжительного периода плавания на расстоянии до трех малых диаметров парамеции вновь тесно сближаются с ней (рис. 13А) и остаются у поверхности клетки даже после ее гибели (рис. 13Б).

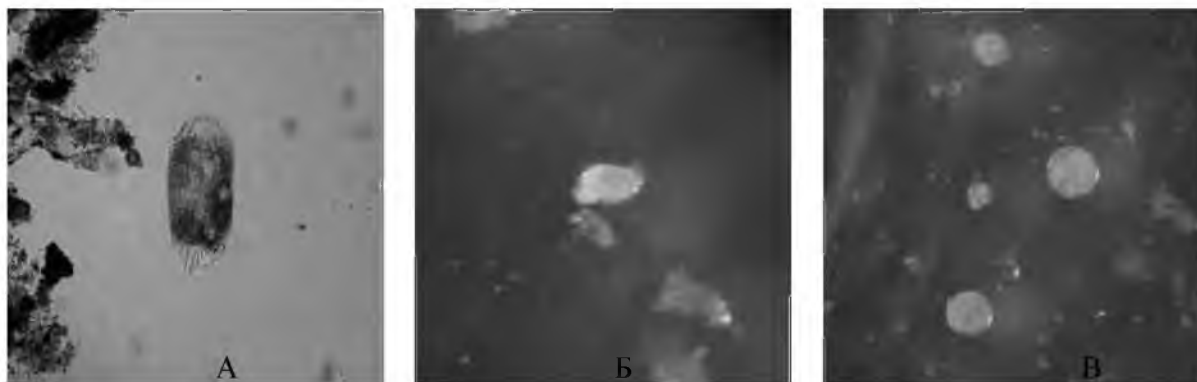


Рис. 3. *Stylonychia mytilus*. Нормальная форма (А), промежуточная (Б) и конечная (В) стадии набухания клеток при нарушении осморегуляции

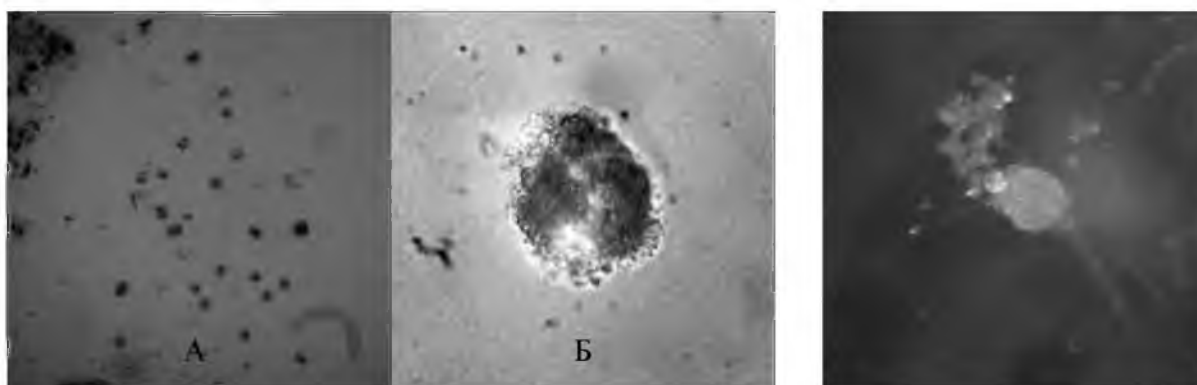


Рис. 4. *Stylonychia mytilus*. Гибель (А), сопровождающаяся везикуляризацией цитоплазмы (Б) при контакте с флотореагентом РА-14 (концентрация 0.001 мг/л)

Рис. 5. *Stylonychia mytilus*. Везикуляризация цитоплазмы с частичным ее выбросом под действием флотореагента РА-14 (концентрация 0.2 мг/л)

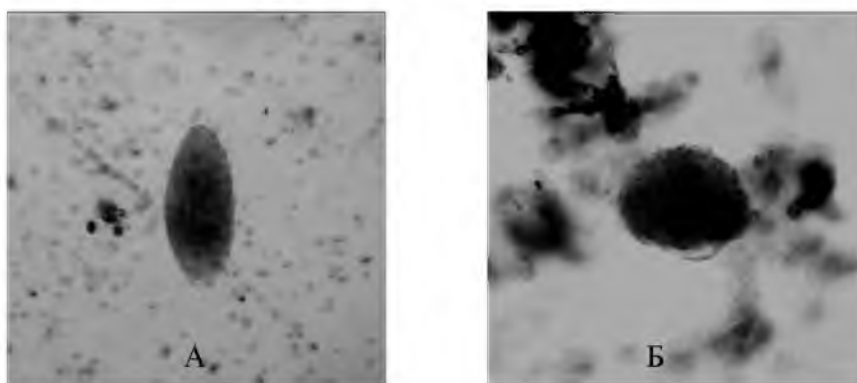


Рис. 6. *Paramecium bursaria*. Везикуляризация цитоплазмы с образованием эктоплазматического поверхностного пузыря под действием флотореагента РА-14 (концентрация 0.2 мг/л)

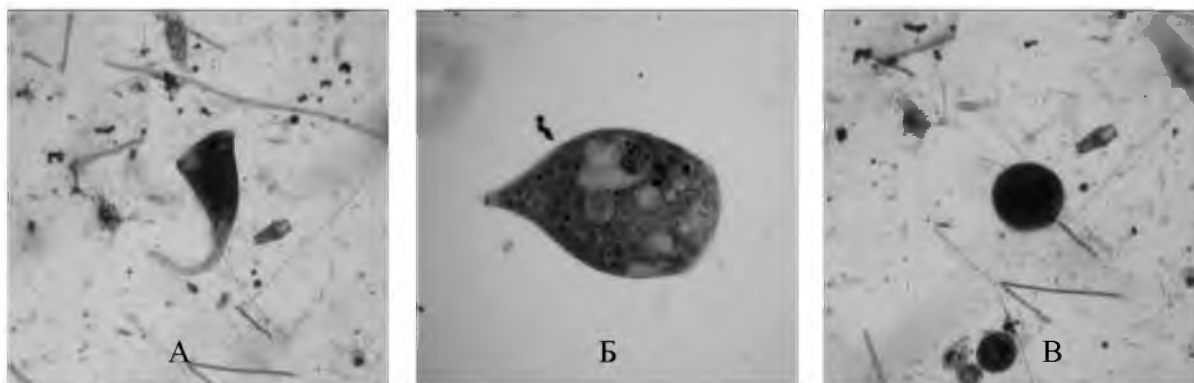


Рис.7. *Stentor polymorphus*. Общий вид инфузории (А), набухание (Б) и образование цисты (В) в растворе флотореагента РА-14 (концентрация 0.1 мг/л)



Рис.8. *Vorticella convallaria*. Общий вид инфузории (А), набухание (Б) и выбрасывание цитоплазмы (В) в растворе флотореагента РА-14 (концентрация 0.1 мг/л)

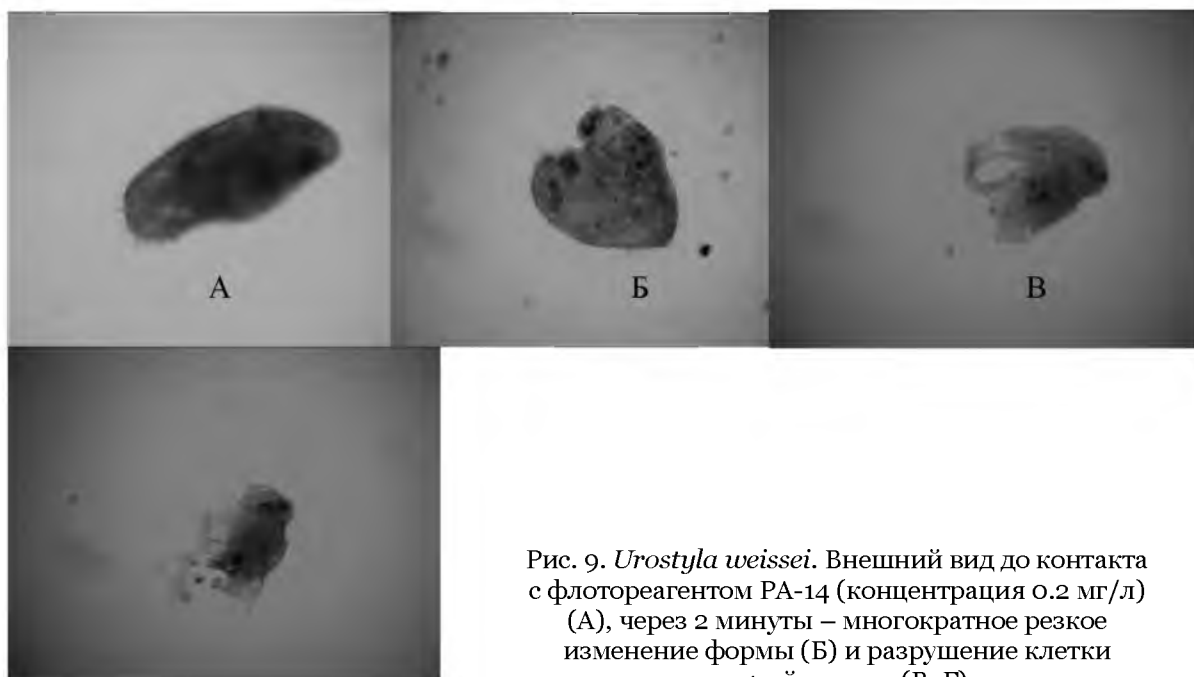


Рис. 9. *Urostyla weissei*. Внешний вид до контакта с флотореагентом РА-14 (концентрация 0.2 мг/л) (А), через 2 минуты – многократное резкое изменение формы (Б) и разрушение клетки на 4-ой минуте (В, Г)

Г

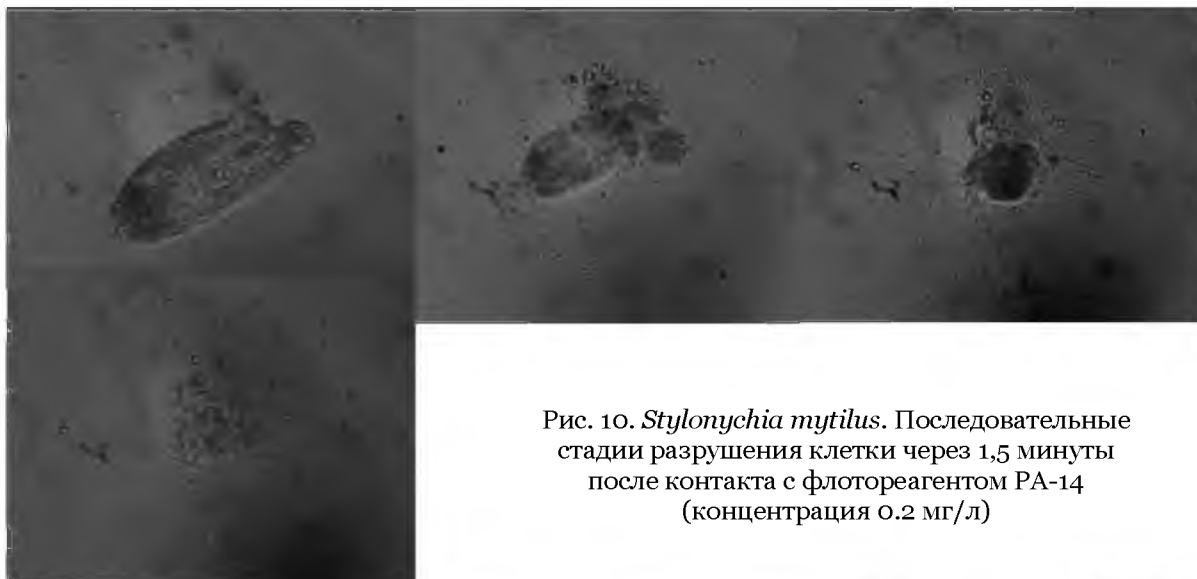


Рис. 10. *Stylonychia mytilus*. Последовательные стадии разрушения клетки через 1,5 минуты после контакта с флотореагентом РА-14 (концентрация 0.2 мг/л)

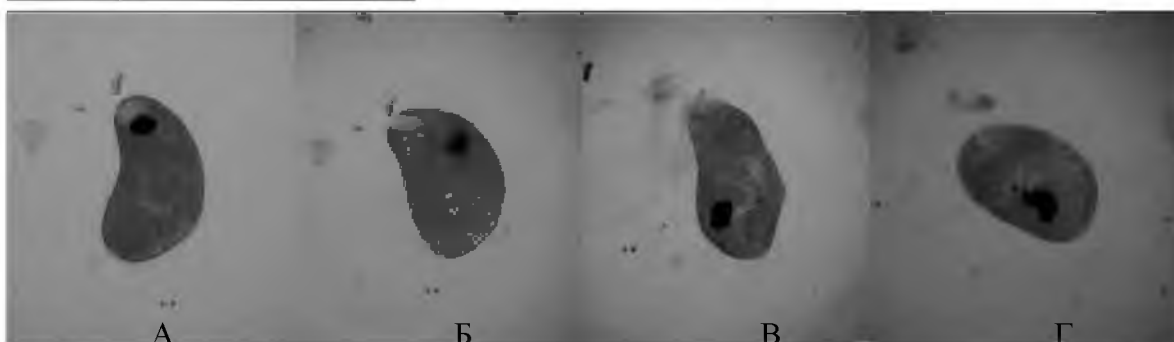


Рис. 11. *Colpidium campyllum*. Внешний вид до контакта с флотореагентом А-14 (А), изменение формы (Б) и выбрасывание части цитоплазмы (В) перед инцистированием (Г)



Рис. 12. *Spirostomum ambiguum*. Внешний вид до контакта с флотореагентом А-14 (А), изменение формы (Б) и нарушение движения (В) под его воздействием (0.2 мг/л)

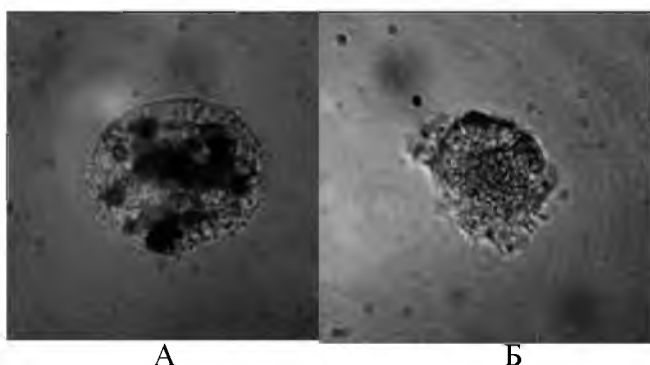


Рис. 13. Выброшенные после контакта с флотореагентом РА-14 симбионты *Zoochlorella* sp. окружают хозяина *P. bursaria* (А) и остаются на нем после (его) гибели (Б)

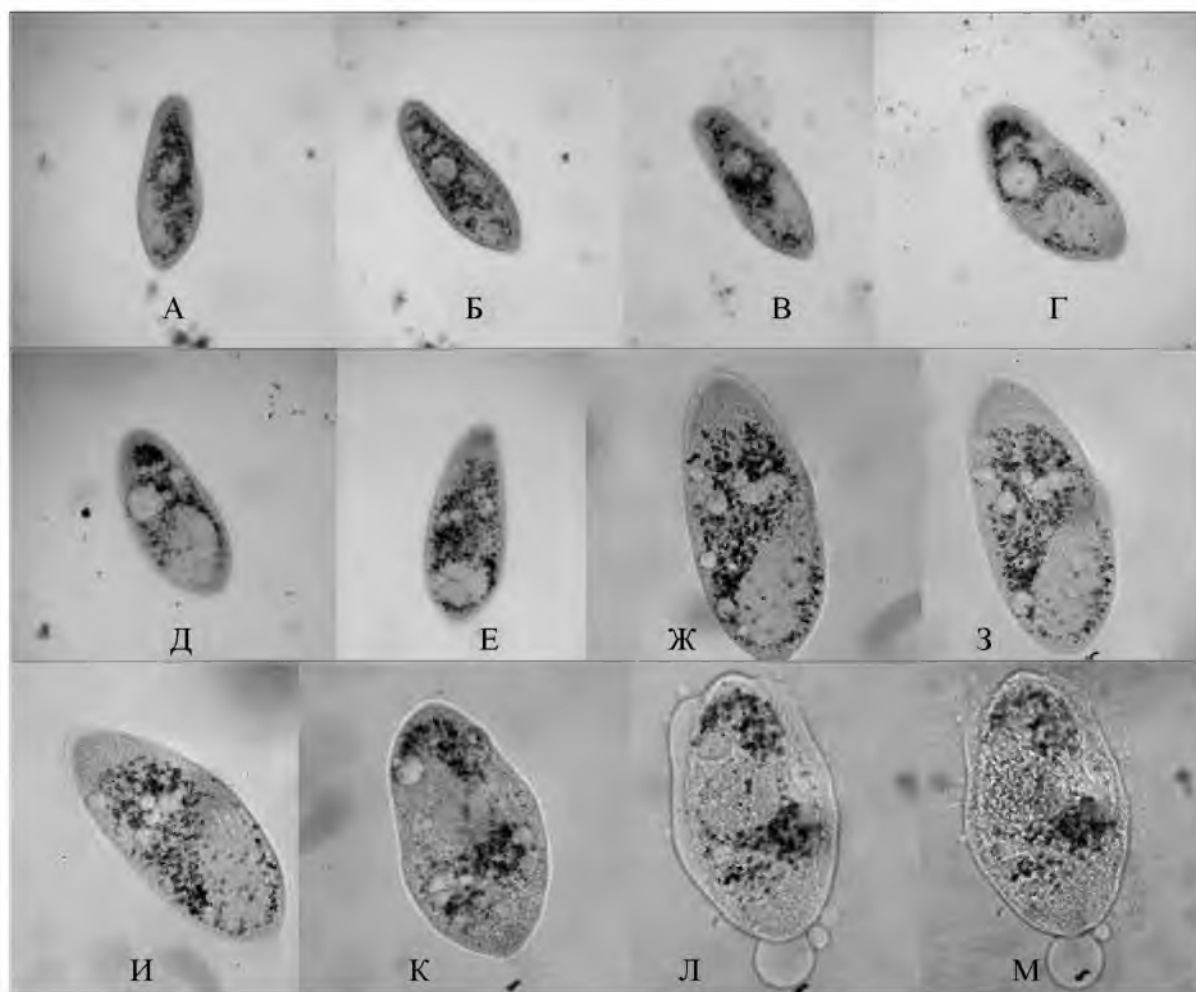
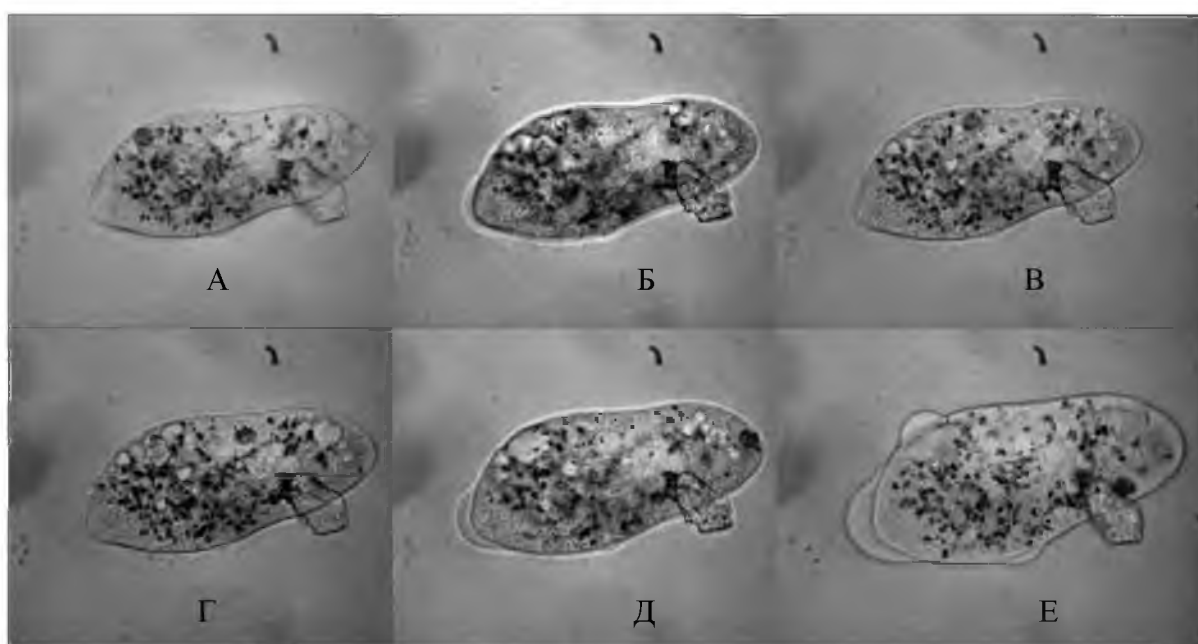


Рис. 14. *Paramecium caudatum*. А–М: последовательность внутриклеточных изменений под действием летальной (0.2 мг/л) концентрации флотореагента РА-14



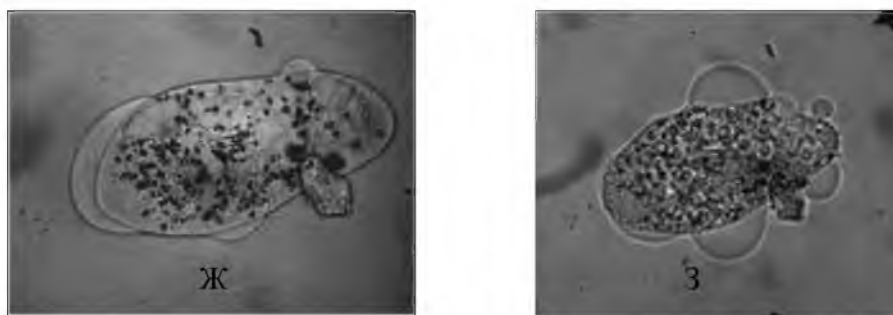


Рис. 15. *Paramecium caudatum*. А–З: последовательность внутриклеточных изменений под действием летальной (0.4 мг/л) концентрации флотореагента РА-14

Ниже приведен один из протоколов регистрации изменения состояния *P. caudatum* после внесения в среду исследуемого флотореагента.

Протокол от 5. 6.05.2008 г. *Paramecium caudatum*. Начало эксперимента – 10.20 час. 3 экземпляра инфузорий в 2 каплях воды на предметном стекле (внешний вид – см. рис. 14А).

Соединение среды с инфузориями через «мостик» с 2 каплями реагента РА-14 (концентрация 0.4 мг/л).

Изменения в состоянии инфузорий:

- быстрое движение в капле;
- мене чем через 1 мин. – четкое обособление эктоплазмы и области макронуклеуса (рис. 14Б);
- следующие примерно 15 минут – интенсивное перемещение пищеварительных вакуолей в эндоплазме с постепенным освобождением от вакуолей значительной области в задней половине и образованием в разных местах 3-6 пульсирующих вакуолей (рис. 14В-14Д); клетка несколько раздувается;
- «исчезает» макронуклеус, появляются новые пульсирующие вакуоли – образуются из альвеол пелликулы (рис. 14Е-14З), инфузория принимает почти нормальную форму, быстро перемещается в течение примерно 10 мин., после чего замедляет движение;
- около 5 минут вращение на одном месте с интенсивной работой до 10 пульсирующих вакуолей и раздуванием тела (рис. 14И);
- движение прекращается, работа пульсирующих вакуолей замедляется, их число уменьшается, раздувание усиливается (рис. 14К);
- примерно на 50-й минуте движение полностью прекращается, отстреливаются трихоцисты, на поверхности появляются мелкие пузырьки, заполненные эктоплазмой;
- пузырьки на заднем конце тела быстро увеличиваются, в передней части клетки происходит разрушение пелликулы (рис. 14Л, 14М).
- гибель инфузории.

Заключение

Результаты экспериментов по влиянию флотореагента РА-14 на инфузорий позволяют предположить, что у них имеется ряд генетически predetermined реакций на химическое воздействие, способное нарушать осморегуляцию и целостность покровов. Главные из них – кратковременное инцистирование (пассивная реакция), предупреждающее лизис клетки, и образование множества дополнительных пузырьков пульсирующих вакуолей (активная реакция) на основе альвеол пелликулы, способных поддерживать осмотическое давление на безопасном уровне. Концентрации исследуемого флотореагента, действующие на «подпороговом» уровне, вызывают гибель инфузорий без разрушения клеток, а высокие – «надпороговые» концентрации, преодолевая существующие защитные барьеры, вызывают летальную везикуляризацию цитоплазмы или разрушение наружной плазматической мембраны, приводящее



к полному лизису тела инфузории. Сублетальное действие флотореагента вызывает компактизацию (сопровождается оптическим контрастированием) активных клеточных структур (ядра, вакуолей и др.). Выброс части эктоплазмы, вероятно, предотвращает лизис клетки.

Высокие концентрации флотореагента РА-14 (0.2 мг/л и более) преодолевают существующие у инфузорий механизмы поддержания водного баланса, вызывая быстрый лизис клеток.

Способность СПАВ оказывать токсический эффект при «сверхмалых» концентрациях (0.0005-0.003 мг/л), противодействию которому не обеспечивается эволюционно сложившимися механизмами предопределяет необходимость пересмотра значений ПДК (в воде)

Список литературы

1. Борсук О.Ю. Экологическая оценка качества промышленных сточных вод республики Адыгея с применением методов биотестирования. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Майкоп: Изд-во МГТУ, 2007. – 23 с.
2. Пикуленко С.О. Применение биологического тестирования природных и сточных вод в экологических исследованиях // Записки общества геоэкологов. – 2008. № 1. Эл. ресурс. Режим доступа http://www.ccssu.crimea.ua/internet/Education/geoecology/index_1.htm#PIK
3. Щеткина Т.Н., Лыков И.Н., Черемных Е.Г. Сравнительная характеристика чувствительности простейших одноклеточных организмов к отдельным факторам окружающей среды // Проблемы региональной экологии. – 2007. – № 3. – С. 31-37.
4. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды // Экологические системы и приборы. – 2007. – № 6. – С. 18-20.
5. Черемных Е.Г., Симбирева Е.И. Инфузории пробуют пищу // Химия и жизнь. – 2009. – № 1. – С. 28-31.
6. Щеткина Т.Н. Использование автоматизированной биотехнической системы и простейших одноклеточных организмов для биотестирования объектов окружающей среды. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Калуга: ООО «Граффити», 2007. – 25 с.
7. Garad U., Desai S.N., Desai P.V. Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum* // African J. of Biotechnology. – 2007. – Vol. 6 (19). – P. 2245-2250.
8. Лукин А.А. Токсичность некоторых СПАВ после разложения их в воде // Вторая всесоюзная конференция по рыбохозяйственной токсикологии посвященная 100-летию проблемы качества воды в России: Санкт-петербург, ноябрь 1991 г. – Санкт-Петербург, 1991. – Т. 1. – С. 340.
9. Карпов С.А. Система простейших: история и современность. – СПб.: ТЕССА, 2005. – 72 с.
10. Хаусман К. Протозология. – М.: Мир, 1988. – 336 с.
11. Мажейкайте С.И. Класс Ресничные инфузории Ciliata // Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР / Отв. ред. Л.А.Кутикова, Я.И.Старобогатов. – Л.: Гидрометеиздат, 1977. – С. 46-97.
12. Kitamura A., Hiwatashi K. Mating-reactive membrane vesicles from cilia of *Paramecium caudatum* // The J. of Cell Biology. – 1976. – Vol. 69. – P. 736-740.

THE RESISTANCE'S MECHANISMS OF INFUSORIANS TO CHEMICAL DAMAGES AND THEIR OVERCOMING BY LETHAL CONCENTRATION OF SYNTHETIC SUPERFICIALLY ACTIVE SUBSTANCES (SSAS)

**A.V. Prisyj,
Ju.L. Volynkin,
N.N. Kampos**

*Belgorod State University
Pobedy Str., 85, Belgorod,
308015, Russia*

E-mail: prisniy@bsu.edu.ru

Article contains the results of studying of damaging action of flotation reagent PA-14 on infusorian's cells in vivo. Changes of intensity and character of movement, encysting, destruction of pellicula, temporary and lethal infringement of osmosis' regulation, viscosity increase of ectoplasm and formation of additional pulsing vacuoles are described with illustrations. Sharp increase of osmosis' regulatory activity is marked at action of sub lethal and lethal concentration of toxicant. The phenomenon of numerous emissions of symbiotic zoochlorellae's is registered at contact of infusorians with toxicant.

Keywords: infusorians, flotation reagent PA-14, damages, resistance's mechanisms.