

УДК 581.1; 582.232; 628.394

**А.Г. ДМИТРИЕВА, О.Ф. ФИЛЕНКО, В.И. ИПАТОВА**

Московский госуниверситет им. М.В. Ломоносова, кафедра гидробиологии,  
Ленинские горы, 1, 119991 Москва, Россия  
e-mail: aigdai@mail.ru, ofilenko@mail.ru, viipatova@hotmail.com

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ  
КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *DESMODESMUS COMMUNIS*  
(E. HEGEW.) E. HEGEW. (*CHLOROPHYTA*) В НОРМЕ И ПРИ  
ИНТОКСИКАЦИИ**

Исследована функциональная гетерогенность популяции клеток микроводоросли (*Desmodesmus communis* (= *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Grønb.) на разных этапах ее развития в норме и при интоксикации с использованием метода микрокультур. Этот метод позволяет контролировать состояние и развитие одиночных клеток или ценобиов в малом объеме в течение 80 ч с ежедневным учетом состояния и численности клеток. С его помощью установлено соотношение делящихся, покоящихся и погибших клеток как в норме, так и при интоксикации. Токсиканты ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ , коллоидное серебро) вносили в макрокультуру на лаг-, логарифмической и стационарной фазах роста. Доля покоящихся клеток в макрокультуре в норме была повышенной на лаг-фазе (в начале развития культуры) и на стационарной фазе, в то время как доля погибающих клеток оставалась более или менее постоянной. При разных режимах интоксикации в зависимости от токсиканта, а также фазы развития, на которой вносили токсикант в макрокультуру, количество покоящихся клеток по мере ее развития варьировало. После интоксикации в режиме увеличения токсической нагрузки и последующего пересева культуры в чистую среду соотношение доли делящихся, покоящихся и мертвых клеток со временем было почти таким, как после первичной интоксикации. Замедление деления клеток является одним из основных проявлений токсического воздействия, которое зависит от физиологического состояния культуры и уровня токсического воздействия. Однако при низких концентрациях токсиканта возможно увеличение скорости деления клеток на разных этапах развития культуры.

**Ключевые слова:** водоросли, структура популяции, хлорид меди, нитрат серебра, коллоидное серебро.

**Введение**

Популяцию часто рассматривают как единую систему со многими связями, ведущую себя как целостный организм, в которой составляющие ее особи характеризуются морфологическим, физиологическим и генетическим разнообразием, что обеспечивает ее гетерогенность.

© А.Г. Дмитриева, О.Ф. Филенко, В.И. Ипатова, 2014

Гетерогенность является одним из основных свойств природных и культивируемых популяций. Индивидуумы, образующие популяцию, отличаются возрастом, размерами, скоростью роста и реакцией на изменение условий обитания. Такая неоднородность качественного состава необходима для обеспечения устойчивости популяции и ее адаптации к внешним условиям (Гапочка, 1999). Поэтому характеристика состояния популяции водорослей, помимо включения интегральных показателей, должна содержать параметры гетерогенности. Для характеристики популяции используются обычно две группы показателей – статические (общая численность, плотность) и динамические, описывающие процессы, происходящие в популяции в течение некоторого промежутка времени. Причем и статические показатели не отличаются постоянством, а интенсивность их изменений может оцениваться определенными характеристиками. Важно также учитывать наличие в популяции сложной системы, когда информация от клетки к клетке может передаваться с помощью различных химических агентов – экзометаболитов (Кажлаева и др., 1991), контактного ингибирования (Costas et al., 1993), путем включения информации в клеточную мембрану (Costas et al., 1991) и т.д.

Поскольку длительность существования популяции значительно превышает продолжительность жизни отдельных особей, в ней всегда происходит смена поколений, и если даже численность популяции постоянна, то постоянство – это результат некоторого динамического равновесия процессов, обеспечивающих прибыль и убыль особей. Так, в популяции микроорганизмов отмечают наличие активно делящихся, покоящихся и спонтанно автолизующихся клеток (Уголев, 1987). Особенно эти характеристики проявляются в культурах на стационарной фазе роста (Ждан-Пушкина, Хасанова, 1991).

Физиологическая гетерогенность клеток в популяциях микроводорослей по числу живых и мертвых клеток оценивается с помощью метода люминесцентной микроскопии (Дмитриева, 1988; Дмитриева и др., 2002). Исследовать структуру популяций микроводорослей на разных этапах их развития в норме и при интоксикации можно с использованием метода микрокультур (Филенко и др., 2004), позволяющего отбирать и выращивать отдельные клетки в малом объеме в процессе изучения их роста и развития.

Цель данной работы – изучение функциональной гетерогенности культур клеток микроводоросли *Desmodesmus communis* в норме и в присутствии хлорида меди, нитратного и коллоидного серебра при разных режимах их токсического воздействия с помощью метода микрокультур.

### Материалы и методы

Объектом исследования была альгологически чистая культура зеленой хлорококковой микроводоросли *Desmodesmus communis*, которую выращивали на среде Успенского № 1 в люминостане с интенсивностью

света 5 клк, при 12-часовом чередовании света и темноты, температуре 20–22 °С, 2-кратном перемешивании в течение суток для обогащения культуры  $\text{CO}_2$  и уменьшения оседания клеток. В экспериментах использовали как однократно, так и двукратно синхронизированные культуры водорослей. «Синхронизация» осуществлялась путем выдерживания в темноте в течение 2–3 суток исходной культуры в стеклянных цилиндрах. При таких условиях «старые» (более тяжелые) клетки оседали на дно, а более мелкие «молодые» клетки, которые находились в верхнем слое среды, пересеивали в чистую среду и использовали для проведения экспериментов (размер молодых клеток 2–3 мк). Культура, выращиваемая таким стандартным методом, условно была названа «макрокультурой». Исходная численность клеток на момент проведения опытов составляла 50–100 тыс. кл./мл. Общую численность клеток в процессе роста культуры определяли с помощью светового микроскопа методом прямого подсчета в камере Горяева (Методическое ..., 1991). Жизненное состояние клеток оценивали методом люминесцентной микроскопии.

В качестве модельных токсикантов использовали хлорид меди  $\text{CuCl}_2$  в концентрациях 0,0001; 0,001; 0,01; 0,01 и 1 мг/л (в пересчете на ион меди); азотнокислое серебро  $\text{AgNO}_3$  в концентрациях 0,0001; 0,001; 0,01 мг/л (в пересчете на ион серебра) и коллоидное серебро в концентрациях 0,0001; 0,001; 0,01 и 0,1 мг/л. Токсиканты добавляли непосредственно в макрокультуру на разных этапах ее развития: лаг-, логарифмической и стационарной фазах роста. Исследования проводили в течение 30 сут в трех повторностях для каждой концентрации и контроля.

Функциональную гетерогенность популяции клеток водоросли оценивали с помощью метода микрокультур, позволяющего контролировать состояние и развитие одиночных клеток или ценобиев (Филенко и др., 2004).

Из исходной культуры («макрокультуры») на различных этапах ее развития пипеткой отбирали по 6–12 живых (по показаниям люминесцентной микроскопии) ценобиев. В контроле отбор осуществляли каждые 3–4 сут, в опытах с токсикантом – на основных фазах ее развития. Отобранные ценобии помещали отдельно в камеры Горяева (8–12 повторностей для контроля и опытов). Для выращивания клеток в камерах использовали отфильтрованную среду из макрокультуры. Во избежание высыхания камеры помещали в чашки Петри с небольшим количеством дистиллированной воды. Наблюдение за каждым отдельным ценобием, выращиваемым в камере, проводили в течение 80 ч с ежедневным учетом состояния клеток и численности. Миниатюрные культуры, сформировавшиеся в камерах в результате деления клеток, мы назвали «микрокультурами». Все клетки микрокультур были условно разделены на отмершие (погибающие в процессе наблюдения),

размножившиеся, которые дали потомство автоспор, и покоящиеся, которые остались живыми в течение 80 ч, но не дали потомства.

Основным показателем состояния культуры и функциональной гетерогенности клеток в популяции служило соотношение отмерших, покоящихся и размножившихся клеток (в процентах).

На основе данных, полученных при анализе микрокультур, рассчитывали удельную рождаемость ( $n_{\text{род}}$ ) и удельную смертность ( $n_{\text{смертн}}$ ). Удельная рождаемость представляет собой среднее количество вновь появившихся клеток в микрокультурах, отнесенное к сроку, за который произошло размножение (в расчете на каждую исходную клетку):

$$n_{\text{род}} (\text{кл./сут}) = N_{\text{род}} / (N_{\text{исх}} \cdot \Delta t),$$

где  $N_{\text{род}}$  – общая численность клеток, появившихся в микрокультуре,  $N_{\text{исх}}$  – общая исходная численность клеток в микрокультуре,  $\Delta t$  – время наблюдения (в данном случае 3 сут).

Удельная смертность выражалась как отношение среднего числа погибших клеток в микрокультурах к сроку, за который определялось количество погибших клеток (в расчете на каждую исходную клетку):

$$n_{\text{смертн}} (\text{кл./сут.}) = N_{\text{отм}} / (N_{\text{исх}} \cdot \Delta t),$$

где  $N_{\text{отм}}$  – общая численность клеток, отмерших в микрокультуре за время  $\Delta t$  (3 сут).

Статистическую обработку данных проводили в программе Excel с использованием пакета анализа данных. Оценку токсического действия токсикантов проводили на основании достоверности различий численности клеток в опытах, проводимых в колбах, по сравнению с контролем. Для этого рассчитывали критерий Стьюдента для  $p = 0,05$ .

В присутствии меди в концентрациях 0,1 и 1 мг/л наблюдали достоверное снижение численности клеток водоросли по сравнению с контролем на протяжении всего опыта, а при 0,01 и 0,001 мг/л – достоверное изменение численности в основном к концу эксперимента. При концентрации 0,01 мг/л нитрата серебра (в расчете на ион серебра) наблюдали достоверное снижение численности к концу эксперимента, а при 0,1 мг/л нитрата серебра и коллоидного серебра – достоверное снижение численности клеток на протяжении всего эксперимента.

Структурный состав в популяции оценивали по доле разных фракций клеток в процентах.

### Результаты и обсуждение

Структуру макрокультуры оценивали по состоянию клеток и их готовности к размножению в камере Горяева. После помещения отдельных ценобиов в камеры первоначально клетки находились в состоянии покоя, а затем они либо делились, либо погибали, что приводило к снижению числа покоящихся клеток (Марушкина, 2005).

Как правило, появление новых клеток происходило через сутки. Наблюдения за состоянием клеток в камерах длились 80 ч. С уве-

личением срока наблюдений новые клетки погибали вследствие истощения среды из-за малого объема камеры и увеличения в ней концентрации экзометаболитов. В зависимости от физиологического состояния клетки были условно разделены на отмирающие (погибавшие в период наблюдений), размножавшиеся (давшие потомство автоспор) и покоящиеся (оставшиеся живыми на протяжении срока наблюдения, но не поделившиеся). При этом рост общего числа клеток в микрокультурах был сходен с таковым в макрокультурах, но смена фаз развития (лаг- и логарифмическая фазы) происходила значительно быстрее. Увеличение количества клеток наблюдалось в течение 70–80 ч с момента отбора и внесения клеток в камеры Горяева. Далее было проведено сопоставление средних удельных приростов клеток в макрокультуре на разные сроки ее развития с таковыми в микрокультурах, отобранных в эти же сроки. Расчеты показали, что удельный прирост числа клеток в обоих вариантах близок (коэффициент корреляции 0,96). Эти данные свидетельствуют о том, что развитие процессов в микрокультурах адекватно отражает изменения, происходящие в макрокультурах. Такой подход вполне правомерен для выявления гетерогенной структуры популяции микроводорослей в процессе ее формирования и развития.

Фракционный состав популяции *D. communis* в процессе ее развития в норме (без токсиканта) представлен на рис. 1 (Филенко и др., 2007а, 2008).

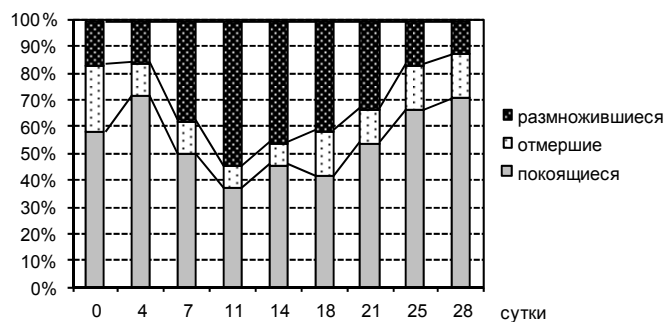


Рис. 1. Изменение фракционного состава макрокультуры *Desmodesmus communis* (%) в процессе ее роста, определенное с помощью метода микрокультур

На начальном этапе развития (1–4-е сут) преобладала фракция покоящихся клеток (до 60–70 %). На 7–18-е сут доля покоящихся клеток снижалась, а доля размножающихся увеличивалась (до 37–55 %), что приводило к увеличению общей численности клеток в макрокультуре. Численность отмирающих клеток составляла 8–12 %. После 21-х сут (по мере выхода на стационарную фазу роста) доля покоящихся клеток снова повышалась (до 70 %), как и на начальных этапах роста культуры.

При первоначальном внесении в камеру 24 клеток через 80 ч в контроле количество их увеличивалось до 42 (см. таблицу).

**Развитие микрокультуры в контроле**

(приведены средние значения числа клеток по 12 повторностям)

Срок развития макрокультуры, сут	Срок развития микрокультуры, ч							
	0	4-6	22-26	29-32	45-49	51-54	70-74	77-81
0	24,7 ±0,8	24,7 ±0,8	24,7 ±0,8	24,7 ±0,8	28,0 ±1,7	28,3 ±2,4	29,7 ±4,1	30,0 ±3,8
14	24,9 ±1,7	25,2 ±2,3	25,2 ±2,3	25,2 ±2,3	27,7 ±2,8	27,7 ±2,8	39,7 ±5,2	42,3 ±5,8
28	24,6 ±0,6	24,6 ±0,6	24,6 ±0,6	24,6 ±0,6	24,0 ±0,8	26,0 ±2,4	25,6 ±2,9	27,2 ±0,6

В норме удельная смертность клеток изменялась мало, а удельная рождаемость заметно превышала удельную смертность (рис. 2). Поэтому прирост численности клеток в камере определялся главным образом повышением удельной рождаемости.

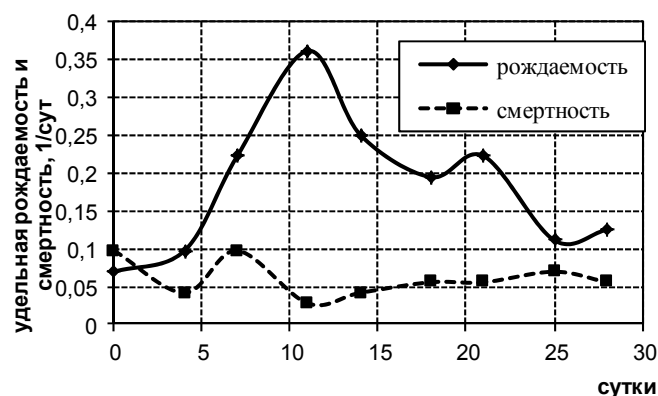


Рис. 2. Динамика изменения удельной смертности и рождаемости клеток в микрокультурах, полученных в разные сроки роста макрокультуры *Desmodesmus communis*

Для выявления функциональной гетерогенности клеток и изменчивости структуры популяции *D. communis* при токсическом воздействии были проведены эксперименты с использованием ряда токсикантов ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ , коллоидного серебра) в разных концентрациях. Вещества вносили в начале опытов, на логарифмической и стационарной фазах.

Наиболее подробно изучена структура популяции при внесении хлорида меди на разных фазах развития культуры: лаг-, логарифмической и стационарной фазах. Внесение хлорида меди (0,0001–1,0 мг/л в расчете

на ион меди) приводило к снижению общей численности клеток в макрокультуре с самого начала опыта пропорционально концентрации меди.

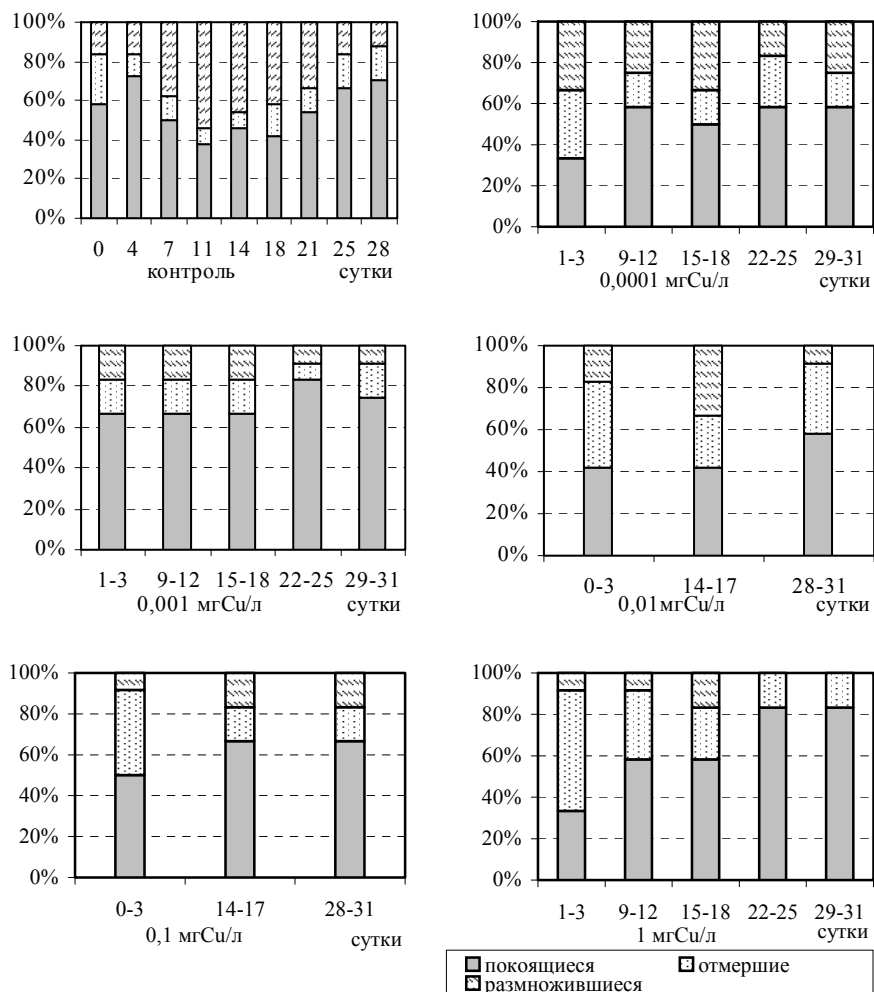


Рис. 3. Динамика изменения фракционного состава макрокультур после внесения меди на лаг-фазе, рассчитанная по результатам, полученным методом микрокультур

При постепенном внесении меди в концентрации 0,0001–1,0 мг/л по мере развития культуры доля покоящихся клеток варьировала и увеличивалась в связи с замедлением процесса размножения клеток, особенно при выходе на стационарную фазу роста. На разных этапах развития макрокультур при разных концентрациях меди изменялись показатели смертности и размножения. На лаг-фазе смертность клеток была выше. В дальнейшем, по мере роста макрокультур и адаптации ее к новым условиям, смертность клеток снижалась до уровня, близкого к контролю. Как правило, на стационарной фазе роста макрокультур,

введенной в эксперимент в лаг-фазе, преобладала фракция покоящихся клеток либо приближалась к их уровню в контроле (при 0,1 мг/л), была ниже (при 0,01 мг/л) или выше (при 1,0 мг/л), чем в контроле (рис. 3).

С добавлением меди в культуру на экспоненциальной фазе (14-е сут) численность клеток при всех концентрациях была ниже, чем в контроле, а степень угнетения увеличивалась соответственно повышению концентрации (рис. 4).

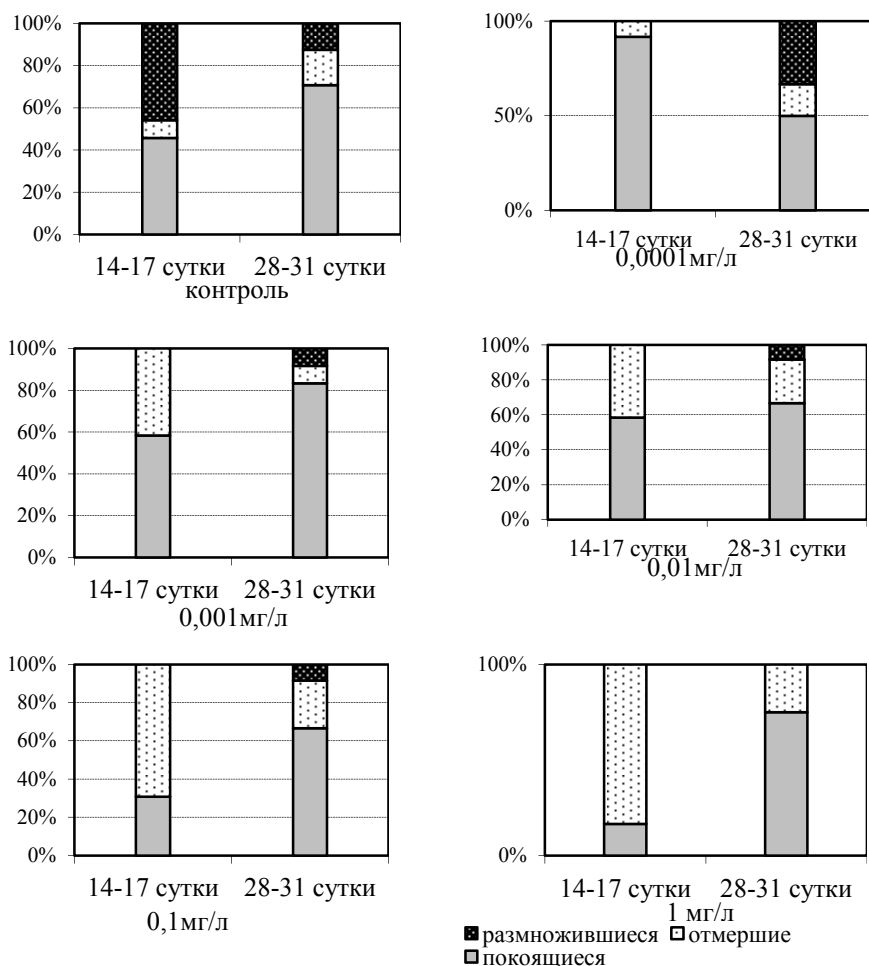


Рис. 4. Динамика изменения фракционного состава макрокультур после внесения меди на экспоненциальной фазе, рассчитанная по результатам, полученным методом микрокультур

В опытах с микрокультурами была отмечена полная остановка процессов размножения сразу после внесения меди при всех исследованных концентрациях: клетки либо погибали, либо переходили в покоящееся состояние. Через две недели после начала эксперимента



наблюдалось восстановление процессов размножения при всех концентрациях (за исключением 0,1 и 1,0 мг/л, при которых происходила гибель клеток). При этом доля размножающихся клеток не превышала 10 %, а большая часть клеток находилась в покое состоянии.

Внесение меди в макрокультуру на стационарной фазе ее роста (рис. 5) не привело к значительному изменению общей численности клеток в отличие от ее внесения на лаг- и экспоненциальной фазах роста. Большую часть клеток макрокультуры на момент внесения меди составляли покоящиеся клетки.

При концентрациях 0,1 и 1,0 мг/л происходила полная остановка процесса размножения, сопровождающаяся высокой удельной смертностью и, соответственно, снижением общей численности клеток. Иная картина наблюдалась при концентрациях 0,001 и 0,01 мг/л меди. На фоне увеличения удельной смертности и рождаемости наблюдался прирост численности клеток по сравнению с контролем вследствие повышенной рождаемости. Фракционный состав макрокультуры в присутствии 0,0001 мг/л меди был близок к контролю с преобладанием покоящихся клеток. Доля размножающихся клеток и, соответственно, удельная рождаемость были несколько ниже, чем в контроле (см. рис. 4, контроль), что вызвало снижение общей численности клеток. Установлено, что для сохранения потенциала популяции большая часть клеток при интоксикации переходит в покое состояние.

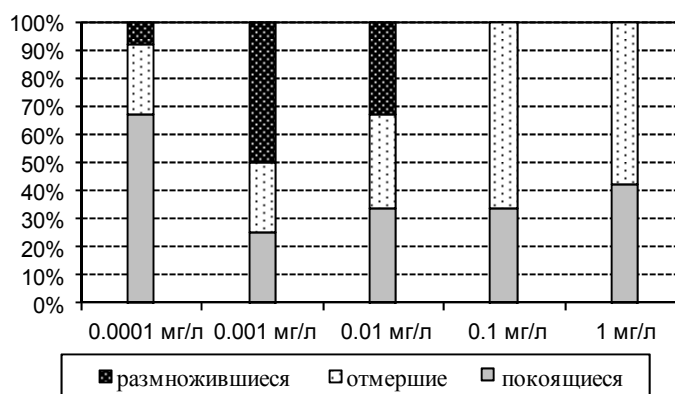


Рис. 5. Фракционный состав макрокультур после внесения меди на стационарной фазе, определявшийся методом микрокультур

Различающийся структурный состав популяции при разных уровнях воздействия хлорида меди, безусловно, зависел от исходного физиологического состояния внесенной культуры. Поэтому для сохранения способности популяции к дальнейшему развитию большая часть клеток переходит в покое состояние в результате замедления их деления. Сравнительный анализ структуры однократно синхронизированной культуры *D. communis*, взятой на стационарной фазе роста при разных концентрациях нитрата серебра (от 0,0001 до 0,01 мг/л в расчете на ион

серебра), показал, что на стационарной фазе в контроле и при концентрации 0,0001 мг/л преобладала фракция покоящихся клеток (60–65 %), за исключением 14–17-х суток при концентрации 0,0001 мг/л, когда число размножающихся клеток возросло до 50 % (Бойчук, 2006; Дмитриева и др., 2007). При этом удельная рождаемость была выше, чем в контроле, в 2 раза. Иной структурный состав популяции отмечен на 21–24-е сут при концентрации 0,001 мг/л серебра с преобладанием фракции размножающихся клеток (до 83 %). При 0,01 мг/л популяция была представлена преимущественно фракцией покоящихся клеток (60–75 %). Однако в присутствии 0,0001 мг/л серебра удельная смертность клеток была в 2 раза выше, чем в контроле, при 0,01 мг/л – более чем в 4 раза, а при 0,001 мг/л она превышала контроль в 10 раз (рис. 6).

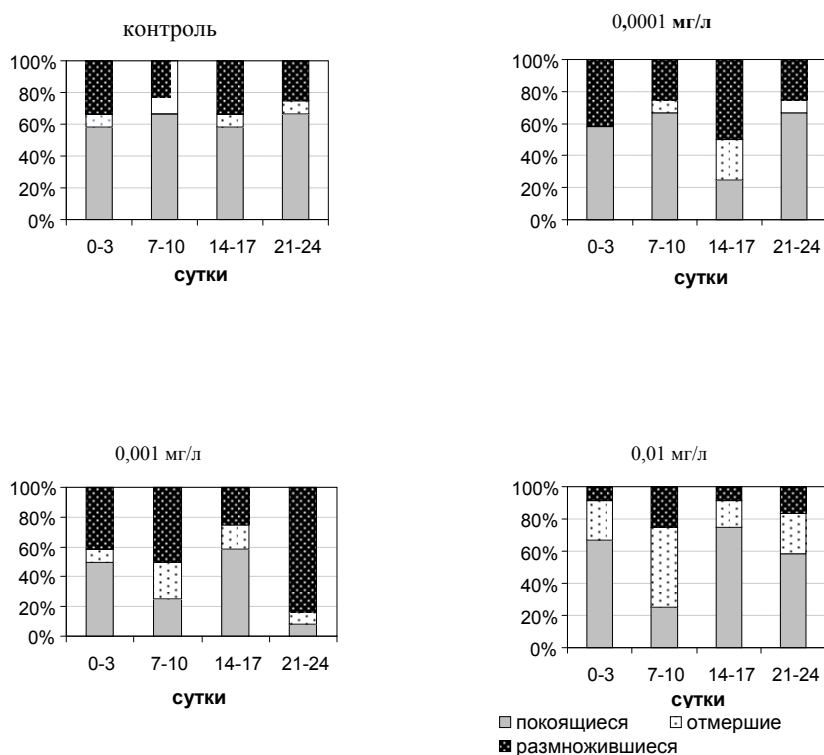


Рис. 6. Фракционный состав макрокультур *Desmodesmus communis* после внесения нитрата серебра на стационарной фазе, определенный методом микрокультур

Такие различия фракционного состава популяций можно объяснить неодинаковым механизмом действия ионов серебра при его разных концентрациях.

Дважды синхронизированная культура *D. comminis*, взятая на логарифмической фазе роста как в контроле, так и в присутствии 0,0001-0,01 нитрата серебра, была представлена преимущественно размножающимися клетками, особенно во второй половине эксперимента (рис. 7).

При концентрации 0,001 мг/л выявлен парадоксальный эффект: если с 14-х по 24-е сутки в популяции преобладали размножающиеся клетки, то к концу эксперимента (28–31-е сут) популяция на 96 % состояла из покоящихся клеток. Это можно объяснить тем, что в присутствии серебра (как и в присутствии меди), возможно, происходит ингибирование синтеза белков, участвующих в делении клеток. При разных концентрациях нитрата серебра различны и удельная рождаемость, и удельная смертность клеток. Так, в контроле и при концентрациях 0,0001 и 0,01 мг/л удельная рождаемость была практически одинаковой к концу эксперимента на фоне повышенной удельной смертности. В присутствии 0,001 мг/л серебра, наоборот, удельная рождаемость была ниже, чем в контроле, более чем в 2 раза, а удельная смертность выше в 1,5 раза.

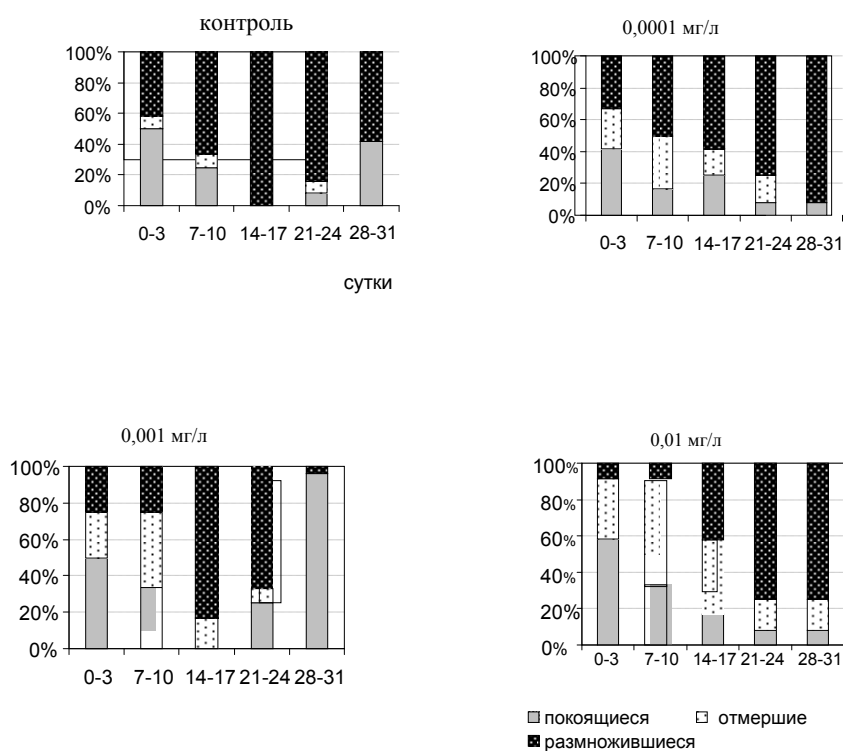


Рис. 7. Фракционный состав дважды синхронизированных макрокультур *Desmodesmus comminis* при действии нитрата серебра, определенный методом микрокультур

Из полученных данных следует, что уровень синхронизации культуры значительно влияет на структуру популяции микроводоросли как в норме, так и в присутствии токсического агента. С различным исходным физиологическим состоянием популяции клеток сопряжена и ее ответная реакция на те или иные уровни токсического воздействия. Фракционный состав популяции *D. communis* определяется уровнем исходной синхронизации (т.е. физиологической активностью клеток), на фоне которой проявляется токсическое действие вещества в зависимости от его концентрации в среде.

Дополнительно были проведены эксперименты по выявлению реакции фракционного состава популяции микроводоросли *D. communis* на присутствие серебра в условиях увеличивающейся его токсической нагрузки по следующей схеме: 0,01 мг/л→0,1 мг/л→0,1 мг/л (нитратного серебра в расчете на ион)→чистая среда. На первом этапе водоросли в течение месяца выращивали при концентрации 0,01 мг/л серебра, а затем (второй и третий этап) их выдерживали при 0,1 мг/л серебра в течение месяца. По окончании третьего этапа интоксикации в популяции оставалось менее 1 % живых клеток. Их отмывали дистиллированной водой и пересевали в чистую среду. Через месяц численность клеток по сравнению с исходной увеличилась в 3 раза, 95 % клеток были живыми. Прирост их был обусловлен высокой удельной рождаемостью (в 2 раза выше, чем в контроле). Структурный состав такой восстановленной популяции оказался близким к составу популяции после первоначальной интоксикации при 0,01 мг/л (Бойчук, 2007; Дмитриева и др., 2007): в обоих вариантах к концу срока наблюдений в популяциях преобладала фракция размножающихся клеток (рис. 8).

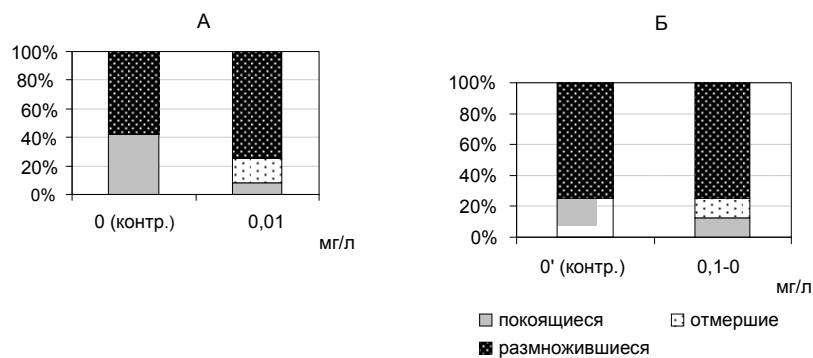


Рис. 8. Фракционный состав культуры водоросли *D. communis* в присутствии нитрата серебра на разных этапах экспозиции: А – на 28–31-е сутки в концентрации 0,01 мг Ag/л (1 этап); Б – на 26–28-е сутки после перемещения из концентрации 0,1 мг Ag/л в чистую среду (4 этап)

Сходный состав популяции можно объяснить тем, что восстановленная после длительной интоксикации популяция клеток *D. communis* могла содержать серебро, накопленное в период первоначального воздействия в концентрации 0,01 мг/л. Восстановление же численности клеток после токсической нагрузки осуществлялось за счет менее 1 % оставшихся, устойчивых к серебру живых клеток. Вполне вероятно, что формирование механизмов адаптации к серебру происходило на первом этапе интоксикации, а на втором и третьем этапах осуществлялся отбор тех устойчивых клеток, которые участвовали в формировании восстановленной популяции с сохранением той фракционной структуры, которая сформировалась на первом этапе воздействия серебра.

Токсичность коллоидного серебра марки Silver-Max для *D. communis* была отмечена лишь при концентрации 0,1 мг/л (Спиркина и др., 2011) и проявлялась в виде альгостатического эффекта в течение 20 сут, после чего происходило постепенное восстановление численности популяции (рис. 8).

При более низких концентрациях (0,0001; 0,001 и 0,01 мг/л) численность клеток изменялась в пределах уровня контроля. Если контрольная культура состояла в основном из размножившихся и покоящихся клеток, то в присутствии 0,1 мг/л коллоидного серебра доля отмерших клеток достигла максимума на 19-е сутки (76 %), а доля размножившихся составляла всего 2 %.

Однако по мере восстановления численности к концу эксперимента (24-е сут) в популяции преобладала фракция покоящихся клеток (65 %), доля размножающихся возросла до 23 %, а отмерших было около 6 %. При этом структурный состав популяции после восстановления численности клеток стал сходным со структурой популяции в контроле в эти же сроки, что может свидетельствовать либо о формировании адаптации водорослей к действию коллоидного серебра, либо о снижении концентрации действующего вещества за счет адсорбции на стенках сосуда или связывания метаболитами.

Полученные результаты показали, что функциональная гетерогенность популяции микроводоросли *D. communis* (наличие в популяции клеток разного физиологического состояния – размножающихся, отмерших и покоящихся) зависит от исходной физиологической активности клеток, соотношения уровней удельной рождаемости и удельной смертности при разных уровнях токсического воздействия.

В норме (в отсутствие токсиканта) в культуре, развивающейся согласно логистической кривой, на стационарной фазе роста и короткой лаг-фазе преобладает фракция покоящихся клеток. Колебательные процессы, протекающие в популяции при воздействии токсического агента со сменой фракций покоящихся, размножающихся и отмирающих клеток, отражают этапы развития популяции в длительном отрезке времени и последующий ее статус в измененной среде. Замедление деления клеток особенно часто наблюдается при неблагоприятных

воздействиях и может рассматриваться в качестве защитного механизма, позволяющего сохранить целостность популяции и ее способность к последующему существованию, о чем свидетельствуют эксперименты по длительной интоксикации нитратом серебра. Главным процессом, определяющим динамику развития популяции, является размножение, а изменение скорости прироста популяции связано с изменением рождаемости клеток. Основным механизмом воздействия исследованных токсикантов является замедление деления клеток, которое наблюдается, как при высоких, так и при низких концентрациях токсиканта. При адаптации культуры или устранении неблагоприятного фактора покоящиеся клетки вновь переходят к размножению, восстанавливая численность популяции.

### Выводы

1. Метод микрокультур позволяет выявить функциональную гетерогенность клеток макрокультуры микроводоросли *Desmodesmus comminis* как в норме в процессе ее развития, так и при интоксикации.

2. Доля покоящихся клеток в макрокультуре в норме повышена на лаг-фазе (в начале развития культуры) и на стационарной фазе, в то время как доля погибающих клеток более или менее постоянна.

3. При разных режимах токсического воздействия, как правило, большая часть клеток переходит в покоящееся состояние, тем самым сохраняя возможность восстановления численности клеток после снятия токсической нагрузки.

4. После длительной 3-этапной интоксикации нитратом серебра и снятия токсической нагрузки структура восстановленной популяции соответствует структуре после первичной интоксикации.

5. Ответная реакция культуры при воздействии токсиканта зависит не только от степени токсического воздействия, но и от уровня синхронизации введенной культуры.

6. Замедление деления клеток является одним из основных проявлений токсического воздействия исследованных токсикантов. Оно зависит от физиологического состояния культуры, уровня токсического воздействия и способствует сохранению популяции. При низких уровнях воздействия токсиканта возможно усиление скорости деления клеток на разных этапах развития культуры.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бойчук Т.В. Закономерности влияния серебра на микроводоросли (на примере лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2007. – 24 с.

Бойчук Т.В. Изменение структуры популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром // Естеств. и техн. науки. – 2006. – 26(6). – С. 135–140.

- Гапочка Л.Д. Популяционные аспекты устойчивости цианобактерий и микроводорослей к токсическому фактору: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1999. — 55 с.
- Дмитриева А.Г. Метод биотестирования по определению живых и мертвых клеток водорослей с помощью люминесцентной микроскопии // Методы биотестирования вод. — Черногловка, 1988. — С. 85–88.
- Дмитриева А.Г., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л. Физиология растительных организмов и роль металлов. — М.: МГУ, 2002. — 160 с.
- Дмитриева А.Г., Бойчук Т.В., Филенко О.Ф. Гетерогенность популяции *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром // Экол. системы и приборы. — 2007. — (3). — С. 42–45.
- Ждан-Пушкина С.М., Хасанова Л.А. Некоторые аспекты роста культур микроорганизмов. — Уфа, 1991. — 126 с.
- Кажлаева Т.Ф., Плеханов С.Е., Максимова И.В. Зависимость внеклеточной продукции водорослей от физиологического состояния клеток // Биол. науки. — 1991. — (11). — С. 101–105.
- Марушкина Е.В. Исследование состояния популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* в норме и при интоксикации методом микрокультур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2005. — 24 с.
- Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90. — М., 1991. — 48 с.
- Спиркина Н.Е., Дмитриева А.Г., Ипатов В.И., Филенко О.Ф. Реакция хлорококковых водорослей на присутствие микроколичеств серебра // Мат. IV Всерос. конф. по водной экотоксикологии. — Борок, 2011. — Ч. 2. — С. 64–66.
- Уголев А.М. Естественные технологии биологических систем. — Л.: Наука, 1987. — С. 181–183.
- Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Исследование структуры модельной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* методом раздельного культивирования клеток // Сб. мат. междунар. науч.-практ. конф. — М.: МГУ, 2004. — С. 190–195.
- Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Исследование лабораторной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Grèb. методом микрокультур // Гидробиол. журн. — 2007а. — 42(5). — С. 80–88.
- Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Марушкина Е.В. Оценка эффекта меди на модельную популяцию водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Grèb. методом микрокультур // Там же. — 2007б. — 42(6). — С. 53–61.
- Филенко О.Ф., Дмитриева А.Г., Дрозденко (Бойчук) Т.В., Марушкина Е.В. Структура популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Grèb. при интоксикации // Мат. междунар. науч. конф. — Ростов н/Д, 2008. — С. 376–379.
- Costas E., Aguilera A., Gonzales S. Contact inhibition also a control for cell proliferation of unicellular algae? // Gistol. Bull. — 1993. — 184(1). — P. 1–5.
- Costas E., Lopez-Rodas V. Persistence of cell division synchrony in *Spirogyra insignis* (Gamophyceae): membrane proteoglycans transmitting synchronizing information throughout generations // Chronobiol. Int. — 1991. — 8(2). — P. 85–92.

Поступила 19 марта 2013 г.  
Подписала в печать Е.И. Шнюкова

A.G. Dmitrieva, O.F. Filenko, V.I. Ipatova

M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Hydrobiology  
1, Leninskiye Gory, Moscow 119991, Russia

FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF MICROALGAL CELLS *DESMODESMUS COMMUNIS* (E. HEGEW.) E. HEGEW. (*CHLOROPHYTA*) UNDER NORMAL AND TOXIC EXPOSURE

The functional heterogeneity of microalgal cells (*Desmodesmus communis* (= *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Brèb.) was studied at different stages of development under normal and toxic exposure using the method of microcultures that enables to check development of single cells in small volume within 80 hours with a daily view of the state and the number of cells. The method allows to estimate the ratio of dividing, dormant and dead cells under normal and toxic exposure. Toxicants (CuCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, colloidal silver) at different concentrations were added directly to makroculture at different stages of its development: the lag-, logarithmic and stationary growth phases. The proportion of dormant cells in normal makroculture was elevated in the lag phase at the beginning of the development of culture and the stationary phase, while the proportion of dying cells remained more or less constant. The number of dormant cells during growth of the culture varied depending on the toxicant, and the phase of the development of culture. After long periods of repeated intoxication in an increasingly toxic load and subsequent reinoculation of culture in a clean media, the ratio of dividing, dormant and dead cells over time was close to what took place after the initial intoxication. Inhibition of cell division is one of the main factors of toxicity, which depends on the physiological state of the culture and the level of toxicity. The rate of cell division at different stages of culture may be increased at low levels of the toxic exposure.

**Key words:** algae, population heterogeneity, copper chloride, nitrate of silver, colloidal silver.