

(отклонения от среднего) достоверно коррелируют со степенью загрязнения. Таким образом, показатели флуоресценции хлорофилла ассимиляционных тканей высших растений, измеренные портативным флуориметром, могут быть использованы для мониторинга их состояния и оценки благополучия среды обитания.

Чрезвычайно интересной областью является исследование с помощью флуориметра не только листьев растений, но и почек и феллодермы коры. Слой феллодермы в коре древесных растений содержит большое количество хлорофилла и обладает фотосинтетической активностью. Сохранение фотосинтетического аппарата феллодермы древесных и кустарниковых пород в течение всего года делает их удобным объектом для изучения физиологического состояния этих растений при переходе в покой и позволяет получать информацию о состоянии растений не только в период их активной вегетации, а круглогодично.

Работа проводилась при финансовой поддержке Минобрнауки РНП.2.1.1.1699.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона. – Итоги науки и техн. ВИНТИ, сер. биофизика, 1990, 40., с. 49-100.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Маторин Д.Н., Братковская Л.Б., Осипов В.А., Алексеев А.А.,
Куликова Н.А., *Ващанов Г.А.
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
г. Москва, Ленинские горы
matorin@biophys.msu.ru

*Воронежский государственный университет (г. Воронеж)

Биотестирование обычно используется для определения токсического загрязнения водной среды или выработки норм допустимых нагрузок на водные экосистемы. Основными критериями токсичности при этом являются выживаемость организмов различных систематических групп в хронических опытах [1,2]. В последнее десятилетие, в связи с необходимостью организации систем оперативного контроля за токсичностью стоков на промышленных предприятиях, станциях аэрации и очистки и т.д. и качеством природных вод, биотестирование приобрело значительно более широкое значение. Одно из основных требований, предъявляемых к оперативным биотестам - высокая чувствительность к токсикантам различной природы. Методы биотестирования

должны быть информативными, высокочувствительными и работать в режиме реального времени. Водоросли лежат в основе водных экосистем и поэтому могут быть использованы в качестве биоиндикаторов водных сред. Преимуществом использования в биотестировании фотосинтетиков является их высокая чувствительность к загрязнителям. Свет является для них не только источником энергии, но и активным повреждающим фактором, причем процессы повреждения резко активируются при нарушении загрязнителями самых различных стадий метаболизма.

Ранее, нами был предложен метод биотестирования, использующий флуоресценцию хлорофилла для выявления действия токсикантов на водоросли при длительном культивировании в колбах в стандартных условиях [3,4]. Основой флуоресцентных методов является то, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей. Энергия кванта света, поглощенного светособирающим комплексом, может быть превращена в энергию разделенных зарядов, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или за счет рассеяния в тепло. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтез возбуждающем свете (F_m) и условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_o), позволяет определить эффективность первичных процессов фотосинтеза, которая равна $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$. Эффективность первичных процессов фотосинтеза (F_v/F_m) представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма. Максимальное, теоретически возможное значение эффективности утилизации света при фотосинтезе (F_v/F_m) соответствует 0,8, минимальное равно 0. Эффективность утилизацию, близкая к нулю, указывает на ингибирование процессов фотосинтеза.

В настоящей работе рассмотрена возможность проведения биотестирования загрязнений с использованием флуоресценции хлорофилла в клетках микроводорослей *Chlorella vulgaris* при интенсивном культивировании.

Преимущества использования интенсивной культуры хлореллы при культивировании при оптимальных условиях в специальных культиваторах связаны с ее высокой скоростью роста, что позволяет быстро получать большое количество биологического материала, и дает возможность за короткие сроки проследить действие токсикантов на основные фазы роста водорослей в токсикологических экспериментах. В оптимальных условиях выращивания удельная скорость роста интенсивной культуры хлореллы составляла 0.18-0.2 ч при $F_v/F_m = 0.75-0.77$. Время удвоения было 3-часа. В течение суток при непрерывном освещении численность клеток возрастала с 0.5 до 12-15 млн.кл./мл, после чего рост резко замедлялся.

Токсическое действие исследованных веществ проявлялось в ингибировании активности фотосинтеза, измеряемого по переменной флуоресценции F_v/F_m при регистрации на разработанном нами 2-х лучевом

портативном импульсном флуориметре. Как и в опытах со стандартной культурой хлореллы, действие токсикантов на Fv/Fm интенсивной культуры с течением времени характеризовалось фазностью. Это согласуется с ранее установленными общими закономерностями развития токсических эффектов, заключающимися в чередовании фаз угнетения и восстановления показателей физиологического состояния различных организмов в ходе токсикологических опытов [2]. То есть, использование интенсивной культуры хлореллы позволяет проследить за всеми основными фазами развития токсического эффекта, характерными для стандартной культуры в хронических опытах, но в значительно более короткие сроки.

Снижение Fv/Fm водорослей при действии исследованных токсикантов сопровождалось замедлением скорости роста. Как и в опытах со стандартной культурой, рост интенсивной культуры хлореллы полностью прекращался при значениях Fv/Fm от 0.3 и ниже. Связь между Fv/Fm в диапазоне от 0.3 до 0.8 и скорости роста для данных условий выращивания описывалась уравнением степенного типа.

Проведенные нами многочисленные токсикологические эксперименты с тяжелыми металлами, гербицидами, полиароматическими углеводородами (ПАУ), ПАВ, органическими пестицидами и др. показали, что снижение относительного выхода переменной флуоресценции является одной из первичных неспецифических реакций водорослей на воздействие токсикантов. При использовании интенсивной культуры хлореллы в присутствии в среде веществ в токсических концентрациях, способных в дальнейшем привести к нарушению процессов роста водорослей или их гибели, достоверно обнаруживается по Fv/Fm уже в первые 3-4 часа эксперимента, что может быть использовано для экспрессной оценки степени токсичности и пределов токсических концентраций различных загрязнителей.

Наиболее чувствительны водоросли были к действию тяжелых металлов, гербицидов, оловоорганических соединений. Как показали результаты пробит-анализа, токсичность веществ указанных групп для водорослей возрастала в следующей последовательности: цинк < свинец < кадмий < ТПОХ < DCMU < хром < медь < ртуть. Согласно результатам наших экспериментов к действию некоторых токсикантов (ПАВ, ПАУ, фосфоорганических пестицидов) водоросли были значительно менее чувствительны, чем многие животные организмы, что делает водорослевый тест менее эффективным для обнаружения этих групп веществ (табл.).

Экспериментально установленные максимальные концентрации веществ, не оказывавшие достоверного действия как на интенсивную культуру хлореллы (по Fv/Fm) в суточных опытах, так и на стандартную культуру хлореллы в хронических опытах продолжительностью 10-25 суток (наши данные и из различных литературных источников) приведены в таблице. Видно близкое соответствие результатов, полученных при использовании разработанного нами и стандартного водорослевого теста.

Полученные токсикологические результаты указывают на возможность использования флуоресцентных характеристик интенсивной культуры хлореллы для экспрессного обнаружения в водной среде фитотоксических веществ в концентрациях, токсичность которых подтверждается хроническими опытами на аналогичных тест-объектах по стандартной методике. Работа проводилась при финансовой поддержке Минобрнауки РНП.2.1.1.1699 и МНЦ № КР964.

Таблица. Максимальные не действовавшие на хлореллу концентрации некоторых токсикантов, определенные различными методами

Токсикант	Концентрации, мкг/л		
	По нашей методике (в суточных опытах на интенс. культуре)	По стандартной методике (в 10-25 суточных опытах)	ПДК для рыб. хоз. водоемов
Ртуть	0.5	0.1-1	0.1
Медь	5	5-10	1
Свинец	10	10-50	100
Цинк	100	50-200	50
ДСМУ	5	10	-
ТПОХ	2-3	5	1
Фенантрен	500	-	-
Карбофос	$5 \cdot 10^5$	-	0
Хлордодецил ульфат Na (ПАВ)	$5 \cdot 10^4$	10^5	-

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриева А.Г., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л. Физиология растительных организмов и роль металлов. – Изд. МГУ, М, 2002, 159 с.
2. Филенко О.Ф. Методы биотестирования качества водной среды. – Изд. МГУ, 1989.
3. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона. – Итоги науки и техн. ВИНТИ, сер. биофизика, 1990, 40, с. 49-100.
4. Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., and Venediktov P.S. The sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa*. J. Plant Physiol, 1995, 146 (5-6), p.609-613.