

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТАЦИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ПРИ ПОВЫШЕННОМ СОДЕРЖАНИИ NaCl В СРЕДЕ

Суханова Н.В.¹, Фазлутдинова А.И.¹, Хусаинова С.А.², Кабиров Р.Р.¹, Гайсина Л.А.¹, Сафиуллина Л.М.¹

¹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», Уфа, Россия (450000, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а), e-mail: n_suhanova@mail.ru

² Ботанический сад-институт УНЦ РАН, Уфа, Россия (450080, г. Уфа, ул. Менделеева, 135, корп. 3), e-mail: khusainovasa@mail.ru

Изучено влияние раствора NaCl в концентрациях 50,00; 25,00; 12,50; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20 и 0,10 г/л на морфометрические характеристики азотфиксирующей цианобактерии *Desmonostoc cf. muscorum* (C.Agardh ex Bornet & Flahault) Hrouzek & Ventura. Все испытуемые концентрации раствора NaCl приводили к изменению цвета колоний от темного сине-зеленого с серым оттенком до светло-зеленого с желтым оттенком и до бесцветного. Повышенное содержание NaCl в среде приводило к увеличению размера клеток. Растворы соли NaCl в концентрации от 0,39 до 6,25 г/л на 18-й день культивирования вызывали активное спорообразование у цианобактерии. В контроле образование спор наблюдалось через 30 дней после посева. Концентрации хлорида натрия от 0,20 до 0,78 г/л на 30-й день культивирования стимулировали образование гетероцист. В клетках цианобактерии, культивируемой в растворе соли 3,13 г/л в течение месяца, хорошо заметны структуры клеток, похожие на крупные вакуоли, не характерные для клеток цианобактерий. Концентрации соли 12,5-50 г/л были летальными для цианобактерии. При повышенных концентрациях хлорида натрия в среде показатель длины клеток проявляет себя в основном как генетический индикатор, ширина клетки в большинстве случаев выступает как экологический индикатор, что говорит о чувствительности данного признака к условиям среды.

Ключевые слова: цианобактерии, *Desmonostoc cf. muscorum*, раствор NaCl, спорообразование, морфометрические характеристики.

THE RESEARCH OF ADAPTIVE MECHANISMS OF BIOLOGICAL OBJECTS AS A RESPONSE TO THE HIGH CONCENTRATIONS OF NaCl IN THE ENVIRONMENT

Sukhanova N.V.¹, Fazlutfidinova A.I.¹, Khusainova S.A.², Kabirov R.R.¹, Gaysina L.A.¹, Safiullina L.M.¹

¹ M.Akmullah Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Russia (450000, Ufa, street Oktyabrskoy Revolutsii, 3a), e-mail: n_suhanova@mail.ru

² Botanical Garden-Institute, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia (450080, Ufa, street Mendeleev, 135, building 3), e-mail: khusainovasa@mail.ru

The influence of NaCl in concentrations 50,00; 25,00; 12,50; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20 and 0,10 g/l on the morphological characteristics of nitrogen-fixing cyanobacteria *Desmonostoc cf. muscorum* C. Agardh ex Bornet & Flahault) Hrouzek & Ventura was studied. All tested concentrations of NaCl led to changes of the colonies color from dark blue-green with a gray shade to light green with yellow shade to colorless. The high concentration of NaCl in the solution caused an increase of the cells size. On the 18th day in vitro NaCl solutions at concentrations from 0,39 to 6,25 g/l invoked active sporogenesis of the cyanobacteria. The sporulation in control samples was observed after 30 days from the cyanobacteria's inoculation. On the 30th day of cultivation in the concentration of NaCl solution from 0,20 to 0,78 g/l was noted the stimulation of the formation of heterocysts. The appearance of large vacuoles, which are not normal for the cells of cyanobacteria, cultivated in salt solution 3,13 g/l during the month was observed. Concentrations of salt 12,5-50,0 gram per liter was fatal for cyanobacteria. At high concentrations of NaCl in the solution the length indicator of cells approves itself mainly as a genetic indicator. The width of a cell generally acting as ecological indicator that shows the sensitivity of this trait to the environment

Keywords: cyanobacteria, *Desmonostoc cf. muscorum*, NaCl, sporogenesis, morphometric characteristics.

Избыточное содержание хлорида натрия в среде негативно влияет на жизнедеятельность микроорганизмов и растений [3; 7]. Цианобактерии - самая древняя

группа фотосинтезирующих организмов, они заселяют все возможные наземные и водные местообитания, в том числе с высоким содержанием солей. Изучение адаптационных механизмов приспособления цианобактерий к существованию в экстремальных условиях является важной и актуальной проблемой.

Целью нашей работы было изучение эколого-морфологических аспектов толерантности цианобактерии рода *Desmonostoc* к высоким концентрациям хлорида натрия в среде и определение пределов ее устойчивости к данному экологическому фактору. Для реализации поставленной цели выполнены следующие задачи: исследовано влияние растворов разных концентраций хлорида натрия на морфологические и размерные показатели, спорообразование и цикл развития цианобактерии *Desmonostoc* cf. *muscorum*.

Материалы и методы

Для эксперимента в качестве модельного организма был выбран штамм ВСАС (http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/1023) 386 *Desmonostoc* cf. *muscorum* (C.Agardh ex Bornet & Flahault) Hrouzek & Ventura (= *Nostoc muscorum* C.Agardh ex Bornet & Flahault, = *Nostoc linckia* f. *muscorum* (C.Agardh ex Bornet & Flahault) Elenkin). Данная цианобактерия широко распространена в наземных местообитаниях, в том числе антропогенно нарушенных с высоким содержанием токсичных соединений [9].

Культивирование и получение накопительной культуры данной цианобактерии проводили на среде Болда с утроенным содержанием азота. Испытуемые растворы соли *NaCl* готовили методом разведения в следующих концентрациях 50,00; 25,00; 12,50; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20 и 0,10 г/л дистиллированной воды. Растворы хлорида натрия разливали в пробирки, для обеспечения цианобактерии элементами питания добавляли по одной капле концентрированной среды Болда. С помощью микробиологической петли вносили небольшое количество культуры *Desmonostoc* cf. *muscorum*. Пробирки закрывали ватно-марлевыми пробками и культивировали при комнатной температуре на люминостате в условиях естественного освещения, пробирки ежедневно встряхивали для предотвращения оседания культуры на дно пробирки. Работы проводили с соблюдением правил стерильности. Контролем служила среда Болда. Снятие морфометрических показаний и фотографирование тест-культуры проводили дважды: через 18 и 30 дней со дня постановки эксперимента. В обоих просмотрах измеряли длину и ширину 100 клеток цианобактерии, в каждом из опытных растворов и в контроле. Всего выполнено измерение 2200 клеток. Дополнительно отмечали длину трихомов, состояние протопласта, наличие гетероцист и спорообразования, окраску колоний, наличие и характер колониальной слизи.

Фотографирование и измерение клеток проводили с использованием светового микроскопа исследовательского класса с реализацией ДИК-контраста Axio Imager A2 с системой визуализации изображения Axio Vision 4.9.

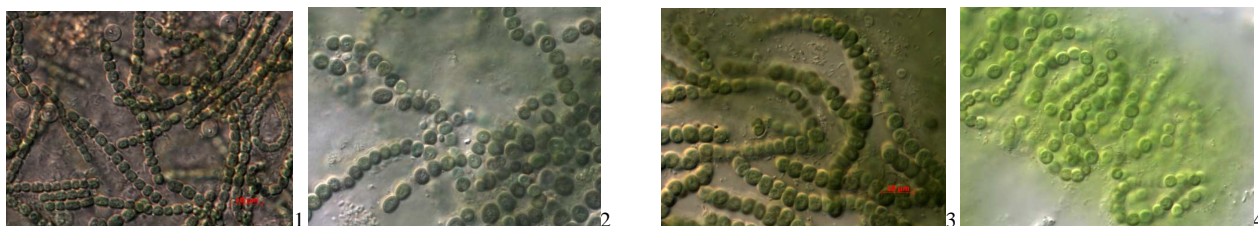
По итогам эксперимента рассчитывали индекс токсичности оцениваемого фактора (ИТФ): $ИТФ = TФ_0 / TФ_k$, где $TФ_0$ – значение регистрируемой тест-функции в опыте, $TФ_k$ – в контроле. При статистической обработке результатов рассчитывали: среднюю арифметическую, ошибку средней арифметической, среднее квадратическое отклонение, коэффициент вариации, критерий достоверности разницы по Стьюденту при уровне доверительной вероятности 0,95 [8].

Изучение структуры морфологической изменчивости *Desmonostoc cf. muscorum* проводили по методу Н.С. Ростовской [6], с использованием программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.1.

Результаты и их обсуждение

Колонии *Desmonostoc cf. muscorum*, выращенные на питательной среде Болда через 18 дней после посева имели темный сине-зеленый цвет с серым оттенком. Трихомы лежали свободно, разнообразно изогнуто, большинство из них были длинными (состояли более чем из 15 клеток). Клетки цилиндрической, бочковидной или сферической формы, перешнурованные. Длина клеток составляла 2,25-5,72 мкм (в среднем 3,93 мкм), ширина – 2,96-4,45 мкм (3,55 мкм). Во время второго просмотра клетки цианобактерии округлились, увеличились в размерах, трихомы распадались на отдельные споры (рис. 1).

Штамм *Desmonostoc cf. muscorum*, культивируемый в концентрациях 0,1-0,39 г/л раствора хлорида натрия, имел колонии от темного до светлого сине-зеленого цвета с желтым оттенком, во время второго просмотра окраска колоний была на несколько тонов светлее (рис. 1). Трихомы лежали свободно, разнообразно изогнуто, большинство из них были длинными (состояли более чем из 15 клеток) с ярко выраженными слизистыми влагиалищами, которые на 30-й день культивирования становились многослойными и значительно шире, а колониальная слизь выглядела более плотной по сравнению с контролем. Форма клеток сферическая или бочковидная. Размеры клеток цианобактерий, выращенных в растворах хлорида натрия, значительно превышают размеры контрольных образцов (табл. 1).



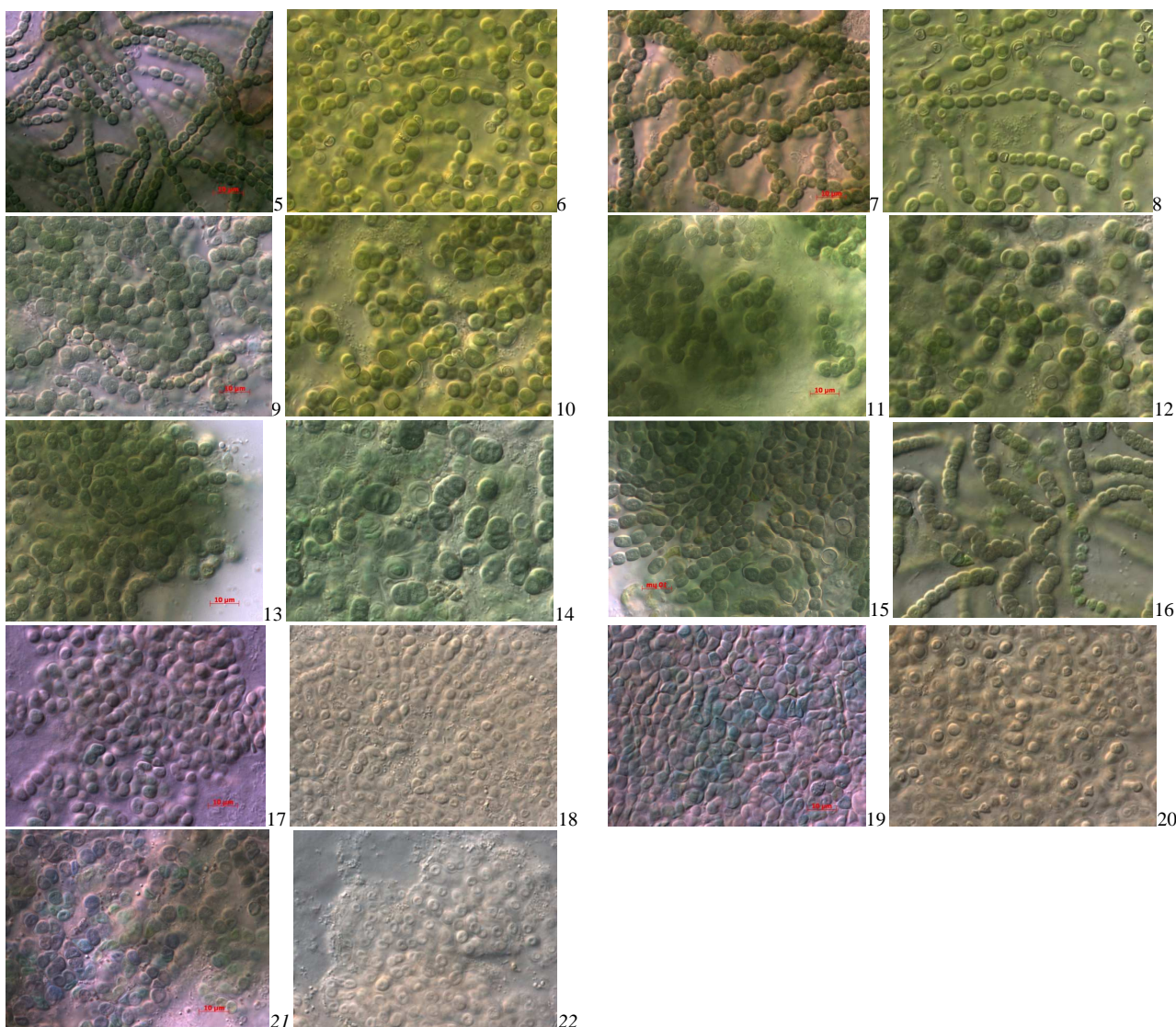


Рис. 1. Фотографии цианобактерии *Desmonostoc cf. muscorum*, культивируемой при разных концентрациях хлорида натрия в среде:

1, 2 – контроль, 3-22 – растворы NaCl разных концентраций (3, 4 – 0,10 г/л; 5, 6 – 0,20 г/л; 7, 8 – 0,39 г/л; 9, 10 – 0,78 г/л; 11, 12 – 1,56 г/л; 13, 14 – 3,13 г/л; 15- 16 – 6,25 г/л; 17-18 – 12,50 г/л; 19-20 – 25,00 г/л, 21-22 – 50,00 г/л). Нечетными цифрами обозначены фотографии цианобактерии на 18-й день культивирования, четными – на 30-й день.

В культуре, выращенной в растворе с концентрацией соли 0,39 г/л, уже на 18-й день культивирования наблюдалось образование спор. В растворах с концентрацией 0,2 и 0,39 г/л после месяца культивирования происходило образование большого количества гетероцист. Активное развитие спорообразующих гетероцистных цианобактерий наблюдалось в почве под влиянием засоления на нефтяных месторождениях Удмуртии [7].

Культура *Desmonostoc cf. muscorum* при концентрациях хлорида натрия 0,78-6,25 г/л имела колонии бледного сине-зеленого цвета с серым или желтым оттенком, со временем цвет становился еще бледнее. Трихомы в большей части короткие, сильно изогнутые, лежали свободно или скученно, в некоторых случаях трихомы плохо различимы (бесформенные). Клетки перешнурованы, сферической, бочонковидной или угловатой формы, размеры

превышали контрольные образцы (табл. 1). На 18-й день культивирования наблюдалось спорообразование, а также лизис отдельных клеток и трихом в целом. При концентрации 0,78 г/л через месяц культивирования в колониях цианобактерии встречались отдельные гетероцисты. В клетках цианобактерии, культивируемой в растворах *NaCl* с концентрацией 0,78-6,25 г/л, часто наблюдались структуры, похожие на вакуоли с клеточным соком, особенно хорошо заметные при концентрации 3,13 г/л во время второго просмотра (рис. 1, 14). В нормальном состоянии такие вакуоли для цианобактерий не характерны [1].

Таблица 1

Значения ИТФ и их статистические характеристики

Концентрация <i>NaCl</i> , г/л	ИТФ	М ширина	М длина	σ	m_m	CV	t_b
50,00	1,26	4,63	3,65	0,73	0,07	15,48	14,78
25,00	1,17	4,15	4,64	0,75	0,07	17,06	9,63
12,50	1,10	4,18	4,06	0,63	0,06	15,20	6,31
6,25	1,38	5,45	4,86	0,78	0,07	15,08	20,55
3,13	1,33	5,04	4,87	0,64	0,06	12,89	19,89
1,56	1,36	5,07	5,12	0,72	0,07	14,06	20,51
0,78	1,22	4,49	4,68	0,76	0,07	16,74	11,99
0,39	1,22	4,51	4,62	0,76	0,07	16,79	12,05
0,20	1,05	4,27	3,59	0,59	0,06	14,89	3,39
0,10	1,16	4,39	4,26	0,77	0,07	17,16	8,47
Контроль		3,93	3,55				

Примечание. ИТФ – индекс токсичности фактора, М - средняя арифметическая, σ - ошибка средней арифметической, m_m - среднее квадратическое отклонение, CV - коэффициент вариации, t_b - критерий достоверности разницы по Стьюденту. Желтым цветом отмечены значения ИТФ, находящиеся на уровне контроля, зеленым – в зоне стимуляции [4].

Колонии испытуемой цианобактерии, культивируемые в растворах хлорида натрия в концентрациях 12,5-50,0 г/л, имели серый цвет с сине-зеленым оттенком. Через месяц культивирования становились бесцветными. Большинство трихомов короткие, бесформенные, лежали скученно, разнообразно изогнуто. Клетки в основном угловатой, неправильной формы, редко сферической. Размер клеток в опыте значительно превышал размер клеток контрольных штаммов. 30-дневные культуры состояли из мертвых клеток.

Проанализировав данные эксперимента, можно сказать, что при культивировании цианобактерии *Desmonostoc cf. muscorum* при повышенном содержании *NaCl* в среде, начиная с концентрации раствора 0,1 г/л, происходит изменение морфологических признаков. Показатели ИТФ (индекс токсичности фактора) по отношению к размеру клеток цианобактерии говорят о том, что повышение концентрации *NaCl* в среде приводит к увеличению размеров клеток. Статистическая обработка результатов с использованием критерия достоверности разницы по Стьюденту (табл. 1) показала, что размеры клеток

цианобактерии, культивируемой в растворах солей всех изученных концентраций, достоверно отличаются от контроля при уровне доверительной вероятности $P=0,95$ и числе степеней свободы $f=99$ (табл. 1). Гайсина и др. [2] отмечали увеличение размеров клеток цианобактерии *Microcoleus vaginatus* (Vaucher) Gomont ex Gomont при низких концентрациях *NaCl* в среде.

Изучение структуры морфологической изменчивости по методу Н.С. Ростовской [6] позволяет выявить пределы общей и согласованной изменчивости отдельных признаков, направления онтогенетических адаптаций в формировании морфологических структур в условиях гетерогенной среды, выделить индикационные признаки и проследить эволюционную значимость отдельных признаков и др.

Показатели длины и ширины клеток испытываемой цианобактерии, культивируемой в питательной среде Болда (рис. 2, табл. 2), обладают относительно высокой общей ($CV=18\%$) и низкой согласованной изменчивостью ($R^2_{ch}=0,007-0,01$). Отмеченные признаки являются экологическими индикаторами.

При повышенных концентрациях хлорида натрия в среде показатель длины клеток в основном проявляет себя как генетический индикатор (длина клеток цианобактерий является генетически обусловленным признаком), ширина клетки в большинстве случаев выступает как экологический индикатор (табл. 2), что говорит о чувствительности данного признака к условиям среды.

Исключением являются результаты эксперимента с раствором 0,78 г/л, где длина и ширина клеток проявляли себя как эколого-биологические индикаторы (рис. 2, табл. 2). Эколого-биологические индикаторы являются наиболее значимыми для индикации как условий среды, так и состояния системы в целом. При данной концентрации в клетках *Desmonostoc cf. muscorum* стали заметны структуры, похожие на вакуоли с клеточным соком.

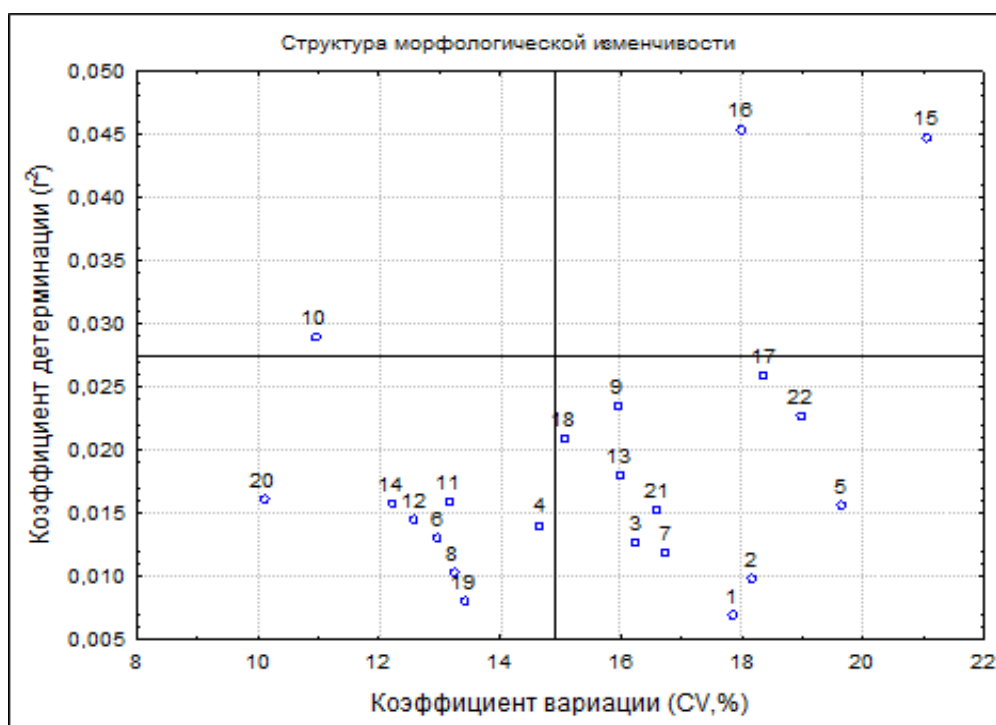


Рис. 2. Структура морфологической изменчивости вида *Desmonostoc cf. muscorum* (усредненные данные). По оси ординат – согласованная изменчивость, или коэффициент детерминации (r^2_{ch}), по оси абсцисс – общая изменчивость (CV, %): 1-2 – контроль, 3-4 – концентрация раствора 50,00 г/л, 5-6 – 25,00, 7-8 – 12,50, 9-10 – 6,25, 11-12 – 3,13, 13-14 – 1,56, 15-16 – 0,78, 17-18 – 0,39, 19-20 – 0,20, 21-22 – 0,10 г/л. Четные цифры – длина клетки, нечетные – ширина клетки.

Таблица 2

Структура морфологической изменчивости *Desmonostoc cf. muscorum*

Индикаторная роль	Генетические индикаторы	Биологические индикаторы	Эколого-биологические индикаторы	Экологические индикаторы
Концентрация NaCl, г/л				
50,00	Длина клетки ³			Ширина клетки
25,00	Длина клетки			Ширина клетки
12,50	Длина клетки			Ширина клетки
6,25		Длина клетки ¹		Ширина клетки ²
3,13	Длина клетки, ширина клетки			
1,56	Длина клетки			Ширина клетки
0,78			Длина клетки, ширина клетки	
0,39				Длина клетки ¹ , ширина клетки ²
0,20	Длина клетки, ширина клетки			
0,10				Длина клетки ²
контроль				Длина клетки, ширина клетки

Примечание. ¹ - тяготеет к генетическим индикаторам, ² - тяготеет к эколого-биологическим индикаторам, ³ - тяготеет к экологическим индикаторам.

Выводы

Все концентрации раствора *NaCl*, начиная с 0,1 г/л, приводят к видоизменению морфологических показателей цианобактерии *Desmonostoc cf. muscorum*: изменяется цвет колоний от темного сине-зеленого с серым оттенком до светло-зеленого с желтым оттенком и даже до бесцветного.

Достоверно установлено, что повышенное содержание *NaCl* в среде приводит к увеличению размера клеток испытуемой цианобактерии. Растворы хлорида натрия в концентрации от 0,39 до 6,25 г/л на 18-й день культивирования вызывали активное спорообразование у *Desmonostoc cf. muscorum*. В контроле образование спор у цианобактерии наблюдалось через 30 дней после постановки эксперимента. В растворах при концентрации соли от 0,20 до 0,78 г/л на 30-й день культивирования у цианобактерии наблюдалось образование большого количества гетероцист. В клетках *Desmonostoc cf. muscorum*, культивируемого в растворах соли 0,78-6,25 г/л, наблюдались структуры, сходные с вакуолями, заполненными клеточным соком, не характерными для клеток цианобактерий.

Установлены пределы устойчивости *Desmonostoc cf. muscorum* к содержанию хлорида натрия в среде: растворы соли в концентрации 12,5-50,0 г/л являются летальными для данной цианобактерии.

Изучение структуры морфологической изменчивости *Desmonostoc cf. muscorum* по методу Н.С. Ростовской при культивировании цианобактерии в растворах *NaCl* показало, что длина клеток проявляет себя в основном как генетический индикатор, ширина клетки в большинстве случаев выступает как экологический индикатор.

Работа выполнена на базе научно-исследовательской лаборатории экологии водорослей им. Лилии Хайбуллиной БГПУ им. М. Акмуллы при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 15-29-05893 «офи-м».

Список литературы

1. Водоросли: справочник / Вассер С.П., Кондратьева Н.В. и др. – Киев : Наук. думка, 1989. - 608 с.
2. Гайсина Л.А., Сафиуллин С.Ю., Хаматдинова Г.Ф., Габдрахманов Д.С., Каназырская В.Ю., Каримова Л.И., Иванова А.П. Оценка влияния засоления на морфологию наземных водорослей и цианобактерий с использованием показателя биологического объема // Актуальные проблемы современной альгологии : тез. докладов IV Международ. конф. 23-25 мая 2012, г. Киев. - 2012. - С. 66-67.
3. Гапочка Л.Д. Об адаптации водорослей. - М. : Изд-во Моск. ун-та, 1981. - 80 с.

4. Кабиров Р.Р., Сагитова А.Р., Суханова Н.В. Разработка и использование многокомпонентной тест-системы для оценки токсичности почвенного покрова городских территорий // Экология. - 1997. - № 6. - С. 408-411.
5. Поварницина Т.М. Основные тенденции изменения почвенной альгофлоры под влиянием засоления на нефтяных месторождениях Удмуртии // 15 Коми республиканская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии». Сыктывкар. 19-23 апр. 2004 : материалы докладов. Т. 2. Молодежная научная конференция Института биологии КомиНЦ УрО РАН. - Сыктывкар, 2004. - С. 234-235.
6. Ростова Н.С. Корреляции: структура и изменчивость. - СПб., 2002. - 308 с.
7. Фазлутдинова А.И. Эколого-флористическая характеристика почвенных диатомовых водорослей Южного Урала : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 1999. - 18 с.
8. Хазиев Ф.Х., Кабиров Р.Р. Количественные методы почвенно-альгологических исследований. – Уфа : БФАН СССР, 1986. - 172 с.
9. Хайбуллина Л.С., Суханова Н.В., Кабиров Р.Р. Флора и синтаксономия почвенных водорослей и цианобактерий урбанизированных территорий. – Уфа : АН РБ, Гилем, 2011. - 216 с.

Рецензенты:

Абрамова Л.М., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией дикорастущей флоры и интродукции травянистых растений ФГБУН «Ботанический сад-институт» УНЦ РАН, Башкирский государственный университет, г. Уфа;

Мигранов М.Г., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биоэкологии и биологического образования ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», г. Уфа.