

## ИНФУЗОРИЯ СПИРОСТОМА КАК ИНДИКАТОР ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Н.А. Тушмалова<sup>1</sup>, Н.Е. Лебедева<sup>2</sup>, Ю.В. Иголкина<sup>3\*</sup>, Е.И. Сарапульцева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> кафедра ВНД

<sup>2</sup> кафедра ихтиологии

\* Корреспондент-автор [juli9991@yandex.ru](mailto:juli9991@yandex.ru)

### Введение

Представители типа простейших (Protozoa) все больше привлекают внимание исследователей, занимающихся поиском надежных индикаторов загрязнения водной среды. Инфузория *Spirostomum ambiguum* выгодно отличается от других видов этого типа. Спиростома имеет достаточно большие размеры (длина 1–3 мм, диаметр 0,3–0,5 мм), что позволяет наблюдать за ней при малом увеличении (x2). В оптимальных условиях спиростома осуществляет равномерное поступательное движение в толще воды со скоростью 2,5 см/мин, в ответ на неблагоприятное воздействие меняя траекторию и скорость движения. Появляются «вертячки», попятное движение и такие «предвестники гибели» как морфологические аномалии тела. Отличительной особенностью этих изменений является реакция на воздействие по принципу «все или ничего», когда все или подавляющее большинство особей популяции проявляют реакцию на внешнее воздействие. Все эти необычные реакции в поведении и особенности морфологии спиростом рассмотрены в данной статье на примере конкретных экспериментов, проведенных авторами в разное время, и продемонстрировавших тем самым возможность

---

<sup>3</sup> кафедра биологии, институт атомной энергетики НИЯУ МИФИ, г. Обнинск

использования спиростом в качестве надежного индикатора химического и физического загрязнения водной среды.

### **Особенности строения и функционирования *Spirostomum ambiguum***

Спиростома в норме имеет характерную червеобразную форму. Проведенное авторами электронно-микроскопическое исследование свидетельствует о сложной морфологической организации протозойной клетки, отражающей полифункциональность спиростомы [1]. Сложная функциональная организация проявляется в способности накапливать и сохранять следовые реакции на действие разных раздражителей. Одним из таких раздражителей является загрязнение среды обитания простейших, которое, изменяя вязкость протоплазмы, модифицирует поведение этих донервных организмов [2]. Как было обнаружено в исследованиях, проведенных авторами, показателями изменения функционального состояния спиростом могут служить объективно регистрируемые реакции: изменение спонтанной двигательной активности (СДА), уровень спонтанных сокращений тела, уровень пищевой возбудимости и состояние ядерного аппарата [3 – 10]. В ответ на раздражение, они способны формировать «следовые реакции», в основе которых, как показали авторы, лежат внутримолекулярные перестройки в цитоплазме [11, 12].

### **Использование поведенческих реакций спиростом в водной экотоксикологии, радиобиологии и медицине**

Известно, что поступательное движение спиростом обеспечивается механизмом совместного биения ресничек, продольным сокращением всего тела и осуществляется за счет мионем, расположенных в цитоплазме. Величина изменения скорости движения и показателя сократимости тела была принята авторами в качестве интегрального критерия функционального состояния инфузорий, меняющегося в зависимости от степени

внешнего воздействия на организм.

В своих работах авторы использовали лабораторную культуру *Sp.ambiguum*. Спиростом содержали в массовой культуре в биологических пробирках при температуре  $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$  в водопроводной дехлорированной воде, отстоянной не менее трех суток и отфильтрованной через обеззоленный фильтр. Пересадку спиростом в свежую воду для поддержания культуры в лог-фазе и их кормление пищевыми дрожжами осуществляли раз в неделю (спиростомы бинарно делятся каждые 2 – 3 дня).

Оценку изменения функционального состояния спиростом проводили с помощью индекса спонтанной двигательной активности (ИДА и/или СДА). Этот показатель изменения поведения был разработан и апробирован профессором Н.А. Тушмаловой при изучении молекулярных механизмов памяти инфузорий [3]. Анализ изменений поведения проводили методом, аналогичным методу «открытого поля». Для этого суспензию простейших переливали на часовое стекло и под контролем микроскопа МБС-10 капилляром по одной спиростоме переносили в специальную пластиковую камеру размером 8 см x 2,5 см x 0,5 см с ячейками диаметром 5 мм и глубиной 1 мм. Инфузорий оставляли в ячейке на 5 мин для привыкания. На окуляр микроскопа были нанесены две перпендикулярные линии (визеры), которые делили поле зрения на 4 сектора. Показателем изменения двигательной активности служил ИДА (или СДА), равный числу пересечений каждой спиростомой визира окуляра микроскопа МБС-10 за единицу времени. Время наблюдения за спиростомами составляло от 1 [8, 9, 13] до 5 мин [14, 15].

Проведенные авторами исследования позволили обнаружить снижение двигательной активности простейших через час экспозиции в воде с триметилловохлоридом (ТМОХ) [6, 14, 15]. Инкубация спиростом в среде с солями тяжелых металлов [16] позволила авторам обнаружить сублетальные и летальные концентрации токсикантов. Так, соли меди, цинка и свинца в концентрациях 0,25 и 0,5 мг/л в течение часа приводили к гибели простейших, а в концентрации 0,025 мг/л – лишь к снижению двигательной активности

простейших на 30 – 40%.

С помощью описанного выше метода авторами была оценена степень загрязнения водоемов, примыкающих к московской кольцевой автомобильной дороге, и выявлены экологически неблагоприятные районы [17]. Изучена степень токсичности азотосодержащих соединений, таких, как аланин и гистидин, дипептид карнозин, релизинг – фактора тиреотропного гормона гипофиза, тетра пептид АКТГ, пептид дельта сна, феромон тревоги карповых рыб, водорастворимые компоненты слизи карпа и его внешние метаболиты [18]. Показано разнонаправленное, но всегда фиксируемое, изменение в поведении спиростом при «пороговой» концентрации изучаемых соединений в водной среде, равной 10 мМ. Вышеописанным методом авторами исследован гомеопатический препарат феназан в ультрамалых дозах ( $D_{15}$ ,  $D_{20}$ ,  $D_{25}$ ) [5, 19]. Выявлены ультрамалые концентрации водорастворимых соединений из кожи карпа, приготовленные по гомеопатической технологии в разведениях  $D_6$ ,  $D_{12}$ ,  $D_{15}$ ,  $D_{20}$ ,  $D_{25}$ ,  $D_{30}$ , которые вызывали замедление двигательной активности простейших [20].

По поведенческому критерию изучено действие  $\gamma$ -излучения в широком диапазоне доз от 0.01 до 1500 Гр ( $LD_{50}$  для простейших более 1000 Гр) на клеточном (и организменном) уровнях [21]. Выявленное снижение СДА сохранялось на протяжении многих генераций (изучено 10 – 15 поколений спиростом). Изменения в поведении проявлялись у значительного числа особей, т.е. происходили по принципу «все или ничего» и отличались от обычно наблюдаемых при увеличении дозы радиационных клеточных эффектов независимостью от величины дозы в диапазоне малых и средних для спиростом доз от 0.01 до 800 Гр [13, 22, 23].

При исследовании кратковременного (от 10 мин до 10 ч) действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) на частоте мобильной связи (1 ГГц) и радаров военно-промышленного комплекса (10 ГГц) с плотностью потока энергии (ППЭ) 5, 10 и 50 мкВт/см<sup>2</sup> обнаружено; а) снижение двигательной активности простейших при всех

значениях ППЭ (ПДУ для населения России составляет  $10 \text{ мкВт/см}^2$  [см. в 22 – 24], б) наличие «пороговой» экспозиции, которая смещается в сторону сокращения допустимого (безопасного) времени нахождения в ЭМП с увеличением ППЭ, в) выход на «дозовое плато», когда величина эффекта не изменяется с увеличением воздействия. При этом показано, что «дозовое плато» может быть бесконечно большим и г) сохранение биологического эффекта в изменении поведения в поколениях простейших (прослежено 10 – 15 генераций) [24]. Очень важно, что при этом микронагрев ячейки и воды, в которой облучались спиростомы, зафиксирован не был.

### **Использование морфологических реакций спиростом в радиобиологии**

Прижизненная компьютерная морфометрия, известная из литературы в качестве метода для анализа активности регенерации планарий [25, 26], измерения скорости их движения [27] и функциональной активности клеток крови [28], была модифицирована авторами для морфометрического тестирования простейших [29]. При разработке метода спиростом помещали на 1 ч в ЭМП с частотой излучения 1 и 10 ГГц и ППЭ  $50 \text{ мкВт/см}^2$ . Сразу после облучения сравнивали форму тела простейших в опытной и контрольной группах. Контроль облучению не подвергался. Измерения морфологических показателей проводили с помощью системы видеонаблюдения, состоящей из микроскопа МБС-10, на который вмонтирована цифровая камера MYscope 300 M (WEBBERS). Фиксирование изображений осуществляли в программе ScopePhoto на мониторе компьютера Pentium 1.5G. Анализ изображений проводили в программе «Image-Pro 3.5». Морфологические изменения у исследованных спиростом проявлялись в виде вертячек и сжатий тела, которые авторы выражали количественными параметрами, заложенными в программе «Image-Pro». Для анализа экспериментально были выбраны наиболее чувствительные категории: Aspect (отношение минимального и максимального диаметров), Diameter (max) (длина тела инфузории), Perimeter (длина тела по периметру) и Roundness (близость

формы тела к окружности). С помощью модифицированной методики выявлен негативный эффект, возникающий у спиростом при одночасовом нахождении в низкоинтенсивном радиочастотном поле с исследуемыми параметрами. Доля особей с морфологическими изменениями в контрольной группе составила  $0,06 \pm 0,02$ , среди облученных особей возростала до  $0,40 \pm 0,03$ , т.е. в 6 раз [29].

## **Заключение**

Авторы привели лишь часть, наиболее, по их мнению, значимых, результатов исследований на инфузориях рода *Spirostomum*, проводимых профессором Н.А. Тушмаловой с 70-х годов XX в. и другими сотрудниками МГУ и Обнинского вуза. В статье показан широкий спектр применения поведенческого критерия для анализа экологических последствий загрязнения водной среды физическими и химическими факторами. В статье рассмотрена возможность морфо-функционального анализа на спиростомах, дающая дополнительные количественные интегральные критерии для экспресс-мониторинга водных сред, т.к. изменения у простейших можно обнаружить уже через час после воздействия и наблюдать за их развитием в нескольких генерациях. В статье сделан акцент на то, что спиростомы способны реагировать на малые и сверхмалые концентрации действующих физических и химических факторов, в том числе при их остром действии. Авторы подчеркивают, что морфофункциональные показатели ответных реакций спиростом коррелируют с реакциями высокоорганизованных животных [2, 30], что делает спиростом незаменимой моделью не только для выявления негативных факторов среды их обитания, но и для объяснения механизмов таких воздействий на одноклеточный и/или многоклеточный организм.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Козлов А.Т., Тушмалова Н.А. Структура и механизмы поведения беспозвоночных. Воронеж. Квадрат, 1995. 172 с.
2. Серавин Л.Н. Влияние химических агентов на двигательную и сократительную системы спироостом // Биологические науки. 1961. №3. С. 65 – 69.
3. Тушмалова Н.А. Исследование механизмов памяти у животных разного уровня филогенеза: Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: ин-т ВНД. 1978. 48 с.
4. Тушмалова Н.А. Функциональные механизмы приобретенного поведения у низших беспозвоночных. М.: МГУ. 1986. 109 с.
5. Тушмалова Н.А., Бурлакова Е.Б., Лебедева Н.Е., Томкевич М.С. Головкина Т.В. Поведение донервных организмов – индикатор эффекта сверхмалых доз // Вестник московского ун-та. 1998. №4. С. 24-26.
6. Лебедева Н.Е., Тушмалова Н.А., Головкина Т.В. Модуляция поведения донервных (простейших) организмов: влияние сверхмалых доз // Региональная конференция международного общества по нейробиологии беспозвоночных. Пущино. 2000. С.86.
7. Саранульцева Е.И., Иголкина Ю.В., Литовченко А.В. Исследование предельно-допустимого уровня низкоинтенсивного электромагнитного облучения на частоте мобильной связи (1 ГГц) по изменению двигательной активности *Spirostomum ambiguum* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т.147, №4. С. 431–433.
8. Иголкина Ю.В. Биологическое действие радиочастотного электромагнитного излучения по показателю активности движения инфузорий: Дис. канд. биол. наук. М.: МГУ. 2010. 197 с.
9. Саранульцева Е.И., Иголкина Ю.В. Изучение зависимости биологической опасности слабого радиочастотного воздействия от значения плотности потока энергии. Эксперименты на инфузориях *Spirostomum ambiguum*, облученных на частоте мобильной

связи (1 ГГц) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. №4. С.459-463.

10. Сарapultцева Е.И., Тушмалова Н.А. Поведенческая активность простейших: место в иерархии критериев биотестирования окружающей среды // Вестник Московского ун-та. 2011. №3. С.3-6.

11. Тушмалова Н.А. Об участии РНК в следовых реакциях спиростом // Эволюция биохимии и физиологии. 1971. Т. 8. С. 498.

12. Тушмалова Н.А. Виды фенотипической памяти у некоторых низших беспозвоночных // Клеточные механизмы памяти. Пущино-на Оке. 1973. С.86-88.

13. Сарapultцева Е.И., Иголкина Ю.В. Наследование снижения спонтанной двигательной активности у одноклеточных гидробионтов *Spirostomum ambiguum* после  $\gamma$ -облучения в малых дозах // Радиация и риск. 2008. Т.17, №3. С. 54-58.

14. Данильченко О.П., Тушмалова Н.А. Влияние оловоорганических соединений на функциональное состояние спиростом // Биологические науки. 1981. № 3. С. 49–54.

15. Данильченко О.П., Тушмалова Н.А. Изменение функционального состояния инфузорий *Spirostomum ambiguum* в растворе триметилловохлорида // Биологические науки. 1982. №2. С. 34–37.

16. Лебедева Н.Е., Горбатова Е.Н., Головкина Т.В., Бурлакова Е.Б. Метод скрининга веществ, действующих в сверхмалых концентрациях // Радиационная биология Радиоэкология. 2003. Т.43, №3. С. 282–285.

17. Лебедева Н.Е., Тушмалова Н.А., Головкина Т.В. Индикация уровня биогенных и химических примесей в природных водоемах, примыкающих к МКАД, с помощью количественной оценки функционального состояния гидробионтов // Междунар. конференция «Экополис 2000». М.: МГУ. 2000. С. 99–100.

18. Тушмалова Н.А., Лебедева Н.Е., Головкина Т.В. Влияние биогенных химических веществ на поведение инфузорий и рыб в биоценозе // Симпозиум по биохимии рыб.



Поведение животных и принципы самоорганизации. Карадаг. 1994. С.6–7.

19. *Томкевич М.С., Лебедева Н.Е.* Гомеопатический гормезис – прогнозирование эффекта // Всероссийская научная конференция «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии». С-Пб. 1999. С. 208.

20. *Лебедева Н.Е., Томкевич М.С., Василине З.М., Головкина Т.В.* Эффект ультрамалых концентраций: действие экстракта кожи рыб на физиологические параметры гидробионтов // Биофизика. 1999. Т.44. Вып.4. С.728–731.

21. *Сарапульцева Е.И.* Спонтанная двигательная активность инфузорий *Spirostomum ambiguum* после  $\gamma$ -облучения в широком диапазоне доз как информативный метод биотестирования // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т.48, №3. С. 346–348.

22. *Бычковская И.Б., Егорова Е.И., Иголкина Ю.В., Федорцева Р.Ф.* Нестохастические эффекты как показатели радиационной опасности для биоты в поставарийных ситуациях // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2007. №2. С. 32–37.

23. *Бычковская И.Б., Сарапульцева Е.И., Иголкина Ю.В., Федорцева Р.Ф., Алексанин С.С.* Нестохастические эффекты как новый тест радиационной опасности для биоты. Сообщение 2. Наследственные формы повреждения // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2010. №3. С. 65–69.

24. *Сарапульцева Е.И., Иголкина Ю.В.* Наследуемое снижение спонтанной двигательной активности *Spirostomum ambiguum* после низкоинтенсивного электромагнитного воздействия на частоте 10 ГГц // Биомедицинская радиоэлектроника. 2010. №1. С. 45–48.

25. *Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю.* Прижизненная морфометрия планарий // Онтогенез. 1984. Т.15. С. 42–48.

26. *Тирас Х.П., Хачко В.И.* Критерии и стадии регенерации у планарий // Онтогенез. 1990. Т.21. С. 620–624.

27. Демџун Н.А., Темурьянц Н.А., Баранова М.М. Динамика скорости движения планарий регенерирующих в условиях электромагнитного экранирования // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2009. Т. 22, № 2. С. 24–32.
28. Махонина М.М. Биологическое действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях блокады опиоидных рецепторов: Автореф. дис. канд. биол. наук. Симферополь: Таврич. нац. унив. им. В.И.Вернадского, 2007. 25 с.
29. Ускалова Д.В., Баранова М.М., Иголкина Ю.В., Сарпульцева Е.И. Применение метода компьютерной морфометрии в исследовании биологического действия низкоинтенсивного радиочастотного излучения на простейших // Биомедицинская радиоэлектроника. 2013. №.3. С. 42–46.
30. Данильченко О.П., Тушмалова Н. А. Экспресс-метод определения токсичности водной среды по функциональному состоянию инфузорий спиростом // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград. 1983. С 120–132.

**Поступила в редакцию:**

## **Резюме**

Рассмотрены экспресс-методы с использованием функциональных и морфологических характеристик инфузорий рода *Spirostomum*, примененные авторами для оценки воздействия на водную среду химических токсикантов,  $\gamma$ -излучения и электромагнитного поля, а также подбора доз лекарственных препаратов. На примере конкретных экспериментальных данных продемонстрирована высокая индикаторная значимость спироостом для мониторинга низкоинтенсивного физического и химического загрязнения водной среде.

*Spirostomum ambiguum*, загрязнение водной среды, биоиндикатор, экспресс-метод

## **Summary**

The morpho-functional methods with ciliates *Spirostomum ambiguum* have been applied for assessing of different toxicants,  $\gamma$ -radiation and electromagnetic pollution in aquatic environment. These methods have been also applied for analyzing of some homeopathic drugs. The experiments showed that *Sp. ambiguum* provides a useful and very sensitive experimental model for bioassay of low doses and low intensity chemical and physical factors in the aquatic environment.

*Spirostomum ambiguum*, pollution of aquatic environment, bioindicator, express-method

### **Сведения об авторах**

**Тушмалова Нина Александровна** – докт. биол. наук, профессор кафедры ВНД, тел.: 8(499)133-80-34;

**Лебедева Нина Евгеньевна** - канд. биол. наук, доцент кафедры ихтиологии МГУ, тел.: 8(499)431-12-31, 8(925)847-93-81; e-mail: [lebedeva1502@yandex.ru](mailto:lebedeva1502@yandex.ru)

**Иголкина Юлия Владимировна** – канд. биол. наук, доцент кафедры биологии ИАТЭ НИЯУ МИФИ; тел.: (48439) 3-11-79; e-mail: [biolab@iate.obninsk.ru](mailto:biolab@iate.obninsk.ru)

**Сарапульцева Елена Игоревна** – канд. биол. наук, зам. зав. кафедры биологии ИАТЭ НИЯУ МИФИ; тел.: (48439) 3-11-79; e-mail: [helen-bio@yandex.ru](mailto:helen-bio@yandex.ru)