

ВЛИЯНИЕ АЛЬГИЦИДОВ НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВОДОРОСЛИ *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb.

© 2020 г. А. В. Лиманцев^{1,*}, М. В. Бидёвкина¹, М. В. Матросенко¹

¹Научно-исследовательский институт дезинфектологии
117246 Москва, Научный проезд, 18, Россия

*E-mail: info@niid.ru

Поступила в редакцию 24.05.2019 г.

После доработки 18.09.2019 г.

Принята к публикации 10.02.2020 г.

Исследовано влияние 2-х альгицидов (бензалкония хлорида и трихлоризоциануровой кислоты) на микроводоросль *Scenedesmus quadricauda*. Показана высокая эффективность подавления роста микроводоросли в культуре. Выявлены различия токсического действия этих веществ, обсуждаются возможные причины этих различий.

Ключевые слова: *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb., микроводоросли, альгициды, биоциды, биотестирование, изоциануровая кислота, трихлоризоциануровая кислота, бензалкония хлорид.

DOI: 10.31857/S0002188120050087

ВВЕДЕНИЕ

Культуру пресноводной хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. используют в системе природоохранных мероприятий с целью выявления загрязнения (токсичности) водных сред (сточных и природных вод), с ее помощью можно выявлять и уточнять токсичность конкретных веществ и их смесей, например, экстрактов из различных материалов и продуктов, включая радиоактивные [1–9], а также исследовать особенности влияния веществ в сверхмалых (10^{-9} М/л и ниже) концентрациях [10]. Биотесты на основе изучения реакции *Scenedesmus quadricauda* применяют для экспериментального установления класса опасности отходов производства [11].

Также эту микроводоросль можно использовать при определении токсических характеристик веществ, предназначенных для целенаправленного уничтожения водорослей, присутствие которых нежелательно. В частности, представляет собой проблему “цветение” воды в открытых и закрытых искусственных водоемах (плавательных бассейнах, аквапарках, акваариумах, фонтанах, декоративных водоемах). Так как размножение клеток является интегральным и адекватным показателем их состояния [12], для определения различных влияний физической или химической природы используют изменения ростовых характеристик культуры водоросли.

Для временного прекращения роста водорослей используют вещества, применяемые в каче-

стве гербицидов в отношении высших растений, имеющие различный механизм действия, в частности, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), а также вещества, содержащие хлор. Для тестирования целевых свойств таких средств нами была применена оценка их влияния на рост культуры *Scenedesmus quadricauda*. Были проверены 2 средства, предназначенные для предотвращения размножения водорослей в плавательных бассейнах — препараты ААС и МР. В качестве действующего вещества в них использованы соответственно бензалкония хлорид (БХ, алкилдиметил(фенилметил)аммония хлорид, 18%-ный водный раствор) и трихлоризоциануровая кислота (ТХЦК, 95.5% д.в., твердые таблетки).

БХ (мол. м. 340.0 D) представляет собой поверхностно активную четвертичную аммониевую соль, обладающую противомикробной активностью широкого спектра, фунгицидной и фунгистатической, антипротозойной, противовирусной активностью [13]. ПДК БХ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования равна 0.3 г/м³.

ТХЦК (мол. м. 232.4 D) относится к дезинфекционным средствам, активность которых обусловлена образованием в воде хлорноватистой кислоты, в процессе ее распада образуется активная форма кислорода, в результате окисляющего действия которого происходит гибель микробной клетки (в том числе в спорной форме). ТХЦК проявляет также фунгицидную и противовирусную активность. В работе [14] показано, что “пороговые концентрации ... ТХЦК ... практически

совпадают с научно обоснованной величиной ПДК циануровой кислоты в воде водных объектов – 6.0 мг/л”. Можно ожидать, что ПДК ТХЦК будет составлять <1.0 г/м³. Цель работы – исследование альгицидного действия препаратов ААС и МР на культуру *Scenedesmus quadricauda*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании применяли альгологически чистую культуру *S. quadricauda*, выращенную на среде Успенского № 1 [15]. Для культивирования использовали климатостат Р-2 (производство ООО “Омикрон”, Россия). Так как чувствительность *S. quadricauda* зависит от режима освещения (весна–осень) [1], было использовано стандартное чередование день–ночь по 12 ч (соответствует периоду равноденствия). Освещенность составляла 2.5 кЛк, температура культивирования 20 ± 1°С. Культивирование проводили в пробирках с объемом среды 25 мл. Пробирки прикрывали колпачками из фольги. Равномерность освещения и перемешивание достигали использованием устройств, осуществляющих вращение круглого штатива с пробирками.

Численность клеток определяли методом прямого счета в камере Горяева в 25-ти больших квадратах. Для каждой концентрации препаратов и контроля использовали трехкратную повторность. Каждую повторность подсчитывали в 2-х половинах камеры Горяева.

Для определения альгицидного действия был выбран период наиболее интенсивного размножения клеток (экспоненциальная фаза), поскольку именно в этот период проявляется наибольшая чувствительность культуры к воздействию токсикантов. Альгицидное средство в различных концентрациях добавляли в культуральную среду в фазе экспоненциального роста (недельная культура). Концентрации БХ составляли 0.045, 0.09, 0.45, 0.9, 1.8, 4.5 мг/л (1.3×10^{-7} , 2.6×10^{-7} , 1.3×10^{-6} , 2.6×10^{-6} , 5.2×10^{-6} , 1.3×10^{-5} М/л; максимальное разведение 4.5×10^{-8}). Испытанные концентрации ТХЦК – 0.095, 0.30, 0.95, 3.0, 9.5, 30.0 мг/л (4.1×10^{-7} , 1.3×10^{-6} , 4.1×10^{-6} , 1.3×10^{-5} , 4.1×10^{-5} , 1.3×10^{-4} М/л, максимальное разведение 9.5×10^{-8} , использовали ряд Фульда с инкрементом 3.16).

Общую численность клеток выражали в тыс. кл./мл (или в соответствующих десятичных логарифмах). При изучении БХ и ТХЦК начальные концентрации клеток водоросли составили соответственно 34.7 и 20.5 тыс. кл./мл.

Коэффициент ингибирования ($K_{\text{инг}}$) (в %) вычисляли по формуле:

$$K_{\text{инг}} = 100 \times (N_{\text{контроль}} - N_x) / N_{\text{контроль}}$$

где N – количество клеток в контроле и опыте. Отрицательные величины коэффициента ингибирования соответствовали активации размножения клеток по отношению к контролю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранные начальные концентрации клеток входят в диапазон концентраций, рекомендуемых [16]; при дальнейшем увеличении плотности культуры водоросли чувствительность к токсикантам уменьшается, что ранее было показано для меди, хрома, кадмия, цинка, стрептомицина [17, 18].

Исходное состояние культуры определяли темпом размножения клеток водоросли. В контроле начальное время удвоения (в первые 2-е сут) составляло от 0.8 до 1.3 сут, что указывало на нормальное состояние культуры. Спустя 2 нед скорость размножения уменьшалась, при этом время удвоения составляло от 5 до 9 сут. Численность клеток при этом достигала от 2.4 до 3.7 млн. кл./мл.

Одной из причин замедления скорости размножения клеток *S. quadricauda* с увеличением их численности является изменение величины рН среды. Например, при рН 7.8 время начального удвоения составило около 1.8 сут, при рН 10.0 – около 9 сут. В контроле рН за 8 сут увеличивался с 7.8 до 10.8 за счет фотосинтеза [19]. Свою роль в ингибировании роста клеток в контроле при продолжительном культивировании могли играть также экзометаболиты.

Культура *S. quadricauda* состоит из значительной части покоящихся клеток, которые не участвуют в размножении. Доля размножающихся клеток различна в разные фазы развития культуры и при воздействии различных веществ. Именно на них в относительно низких концентрациях оказывают влияние тяжелые металлы [20]. При этом уменьшение численности клеток по отношению к контролю при воздействии токсиканта может происходить не за счет гибели клеток, а вследствие перехода клеток в покоящееся состояние. Дополнительный вклад в уменьшение численности клеток культуры вносит процесс их лизиса.

Полученные результаты указывали на высокую эффективность изученных веществ в плане подавления размножения клеток водоросли (рис. 1). Например, значительное снижение роста водорослей при применении БХ достигалось при его концентрациях между 1.3×10^{-6} и 2.6×10^{-6} М/л и больше. ТХЦК также действовала в микромолярном диапазоне (между 1.3×10^{-6} и 4.1×10^{-6} М/л и больше). То есть максимальная эффективность этих веществ была практически в одном и том же диапазоне концентраций. Однако имелось и важное отличие в их действии на клетки водоросли.

Если БХ при высоких концентрациях приводил к полному очищению культуры от клеток, то при максимально высоких испытанных концентрациях ТХЦК оставались жизнеспособные клетки; в присутствии ТХЦК размножение этих клеток не происходило. Численность таких клеток составляла порядка 10–20 тыс./мл и оставалась практически неизменной на протяжении 2-х нед. То есть эффект ТХЦК в значительной степени объясняется альгостатическим действием.

При действии обоих веществ обнаружили явление адаптации клеток к токсикантам. Очень ярко это видно на примере БХ. При концентрации вещества 2.6×10^{-7} М/л было заметно значительное уменьшение скорости роста культуры по сравнению с контролем. Однако между 4-ми и 11-ми сутками размножение клеток становилось даже более интенсивным по сравнению с контролем. Величины численности клеток на плато в контроле и при воздействии БХ выравнивались. Усиление размножения клеток между 4-ми и 11-ми сутками наблюдали при более высокой концентрации БХ (1.3×10^{-6} М/л). Однако, в конечном итоге, при такой концентрации токсиканта клетки полностью погибали. В случае ТХЦК также наблюдали процесс адаптации при концентрации 1.3×10^{-6} М/л. При этом вначале происходило торможение роста, хорошо заметное до 2-х суток культивирования, после чего скорость роста становилась практически равной контрольной, а численность клеток спустя 2 нед также достигала уровня контроля. Даже при концентрации ТХЦК 4.1×10^{-7} М/л влияние вещества различалось в разных фазах роста культуры, при этом в течение первых 2-х сут обнаруживалось ингибирование с последующим повышением скорости размножения и достижением контрольной численности клеток в контроле. То есть малые концентрации токсиканта спустя некоторое время вызывали увеличение скорости размножения клеток по сравнению с контролем.

Отмеченные изменения воздействия токсиканта в разных фазах роста культуры были выражены стимуляцией размножения клеток при низких концентрациях и дальнейшем ослаблении размножения при повышении концентрации токсиканта. Такая же закономерность показана для других веществ-поллютантов (например, меди, хрома, серебра; активация роста происходила соответственно при 1.6×10^{-8} , $3.4\text{--}10.2 \times 10^{-6}$, 9.2×10^{-10} М/л) [1, 20]. То есть активация размножения клеток может служить показателем токсического действия вещества.

Учет адаптивного влияния низких концентраций токсиканта предполагает использование заведомо токсичных концентраций с целью предотвратить снижение чувствительности популяций микроводорослей к альгициду.

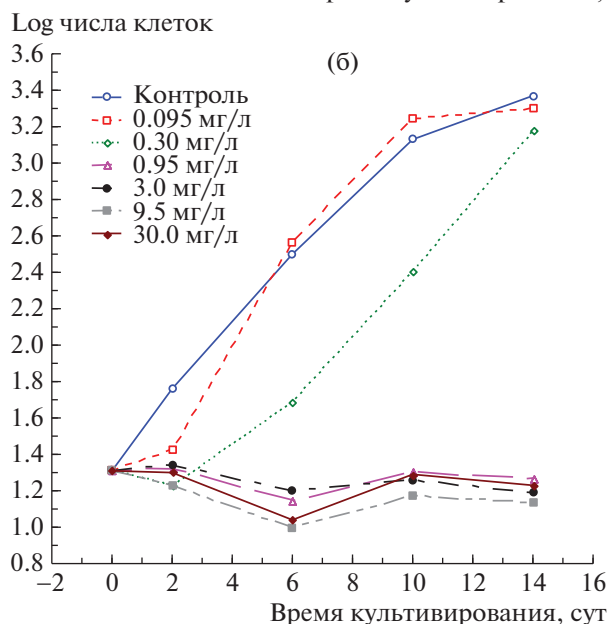
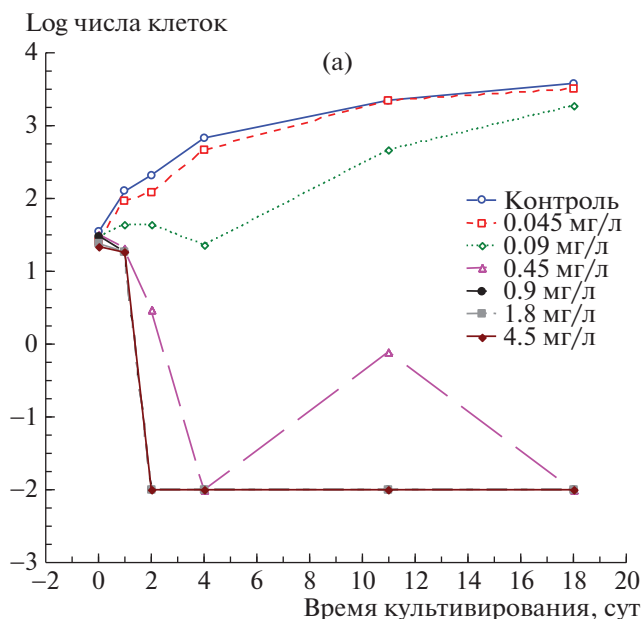


Рис. 1. Рост культуры водорослей при разных концентрациях БХ (а) и ТХЦК (б). На оси ординат 0 соответствует 1000 кл./мл, единичные клетки или полное их отсутствие условно — логарифму-2.

Приведены зависимости ингибирования роста культуры под влиянием БХ и ТХЦК от логарифма концентрации (в тыс. кл./мл) для различных сроков культивирования (рис. 2). Сравнение графиков на рис. 2 указало еще на одно различие влияния БХ и ТХЦК. Например, в случае применения БХ ингибирование роста культуры увеличивалось монотонно по мере возрастания концентрации токсиканта во всем диапазоне времени культивирования, то влияние ТХЦК в начале культивирования практически не зависело от ее concentra-

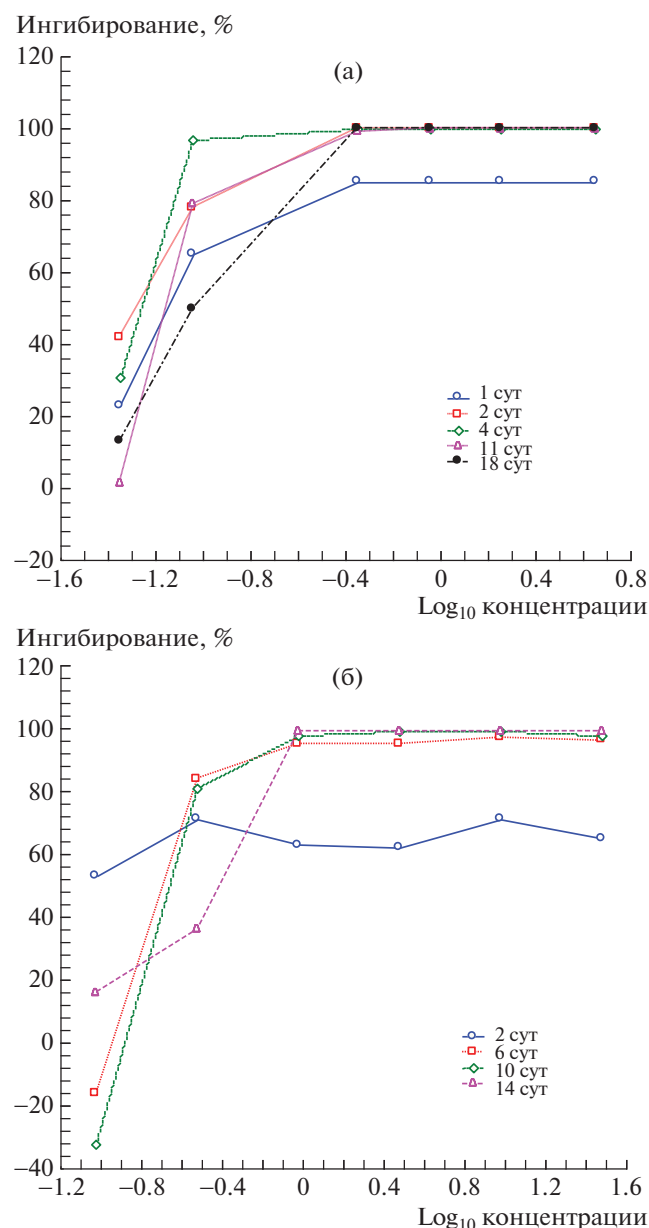


Рис. 2. Зависимость ингибирования роста *S. quadricauda* от концентрации БХ (а) и ТХЦК (б) при различном времени культивирования водоросли.

ции. Это указывало на то, что влияние ТХЦК скорее всего реализуется сложным механизмом, в котором имеется звено, реагирующее по типу “все или ничего” в узком диапазоне концентраций. Причем это звено более чувствительное в сравнении с тем, которое отвечает за “базовую” токсичность. Известно, что ТХЦК содержит в своем составе 3 атома хлора. При растворении ТХЦК в воде хлор отщепляется от молекулы, образуя в воде активный хлор, который оказывает токсическое влияние на водоросль. В то же время при исследованиях на животных не обнаружены

значительные различия токсичности между три- и дихлоризоциануровыми кислотами [14]. Возможно, особенность концентрационной зависимости на 2-е сутки культивирования связана не только с отщепляющимся хлором, но и с влиянием собственно молекулы изоциануровой кислоты: известно, что циануровая кислота высокотоксична в отношении ячменя и редиса [21]. Не исключено, что при этом играет роль также динамика освобождения хлора из состава ТХЦК.

Учитывая, что механизмы действия БХ и ТХЦК различаются, можно ожидать наличие синергичного эффекта при их совместном применении, что можно использовать при создании комплексных альгицидных средств.

Условия культивирования микроводоросли и высших растений близки. При массовом культивировании микроводоросли *Scenedesmus* обычно используют те же соли, что и при выращивании высших растений [22]. Это указывает на возможность использования культуры *S. quadricauda* для тестирования ингибиторов роста (или гербицидов) для высших растений. Данный объект и характеристики его роста можно использовать для экспресс-оценки наличия токсических свойств удобрений, при отборе оптимальных концентраций удобрений и их состава, для контроля эффективности детоксикационных мероприятий, при отборе биостимуляторов и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что, хотя эффективное ингибирование роста культуры микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* испытанными альгицидами достигалось при близких концентрациях, механизм действия этих веществ различался. Например, действие ТХЦК приводило к подавлению размножения клеток. Даже при высоких концентрациях ТХЦК количество клеток водоросли в течение 2-х нед культивирования практически не уменьшалось. В то же время действие БХ приводило не только к прекращению размножения клеток, но и к их полному лизису. Эти особенности следует учитывать при составлении рецептуры альгицидных средств, предназначенных к применению в открытых и закрытых искусственных водоемах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джао Ицзюнь. Влияние изменяющихся токсических нагрузок на структурно-функциональные характеристики водоросли *Scenedesmus quadricauda* в культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, Биол. фак-т, 1994. 19 с.
2. Федосеева Е.В., Сапункова Н.Ю., Терехова В.А. Практическая экотоксикология: оценка чувстви-

- тельности биотест-культур. Уч. пособ. М.: Геос, 2016. 54 с.
3. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей // Федеральный Реестр. ФР.1.39.2007.03223. 2007. 47 с.
 4. *Духовная Н.И.* Показатели развития фитопланктонных сообществ в водоемах с разным уровнем радиоактивного загрязнения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Урал. научн.-практ. центр радиацион. медицины, 2011. 22 с.
 5. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. // ПНД ФТ 14.1:2.4.17-2011. Т 16.1:2:3:18-2011. М., 2011. 28 с.
 6. *Рябухина Е.В., Фомичева Е.М.* Биотестирование и водная токсикология: метод. указания. Ярославль: ЯрГУ, 2012. 53 с.
 7. Оценка токсикологического загрязнения природных вод и донных отложений водных экосистем по коэффициенту регенерации популяции. Рекомендации Р 52.24.695-2007. 20 с.
 8. *Инатова В.И., Дмитриева А.Г., Дрозденко Т.В.* Сравнительная токсичность солей и наночастиц серебра для микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* // Токсикол. вестн. 2016. № 2(137). С. 45–51.
 9. Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. ГОСТ Р 54496-2011. М., 2011. 58 с.
 10. *Маврин Г.В., Смирнова Н.Н., Инюшева А.А., Рощина О.С., Павлова Т.А., Фридланд С.В., Мелкозян Р.Г.* Влияние малых и сверхмалых концентраций соединений Этафосф, Амидофосф и Анифосф на динамику численности тест-объектов *Daphnia magna* Straus и микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* // Экол. промышл. произ-ва. 2014. № 2(86). С. 39–43.
 11. Об утверждении критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды. Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ от 15 июня 2001 г., № 511. 8 с.
 12. *Прохоцкая В.Ю.* Структурно-функциональные характеристики модельной популяции *Scenedesmus quadricauda* при интоксикации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, Биол. фак-т, 2000. 24 с.
 13. *Яремчук А.А., Хишова О.М., Половко Н.П.* Микробиологическое обоснование использования бензалкония хлорида в мягкой лекарственной форме для наружного применения // Вестн. фармации. 2012. № 2(56). С. 39–45.
 14. *Печникова И.А.* Сравнительная оценка токсичности и опасности сим-триазинов в воде на примере производных циануровой кислоты и меламина: Дис. ... канд. мед. наук. М.: НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН, 2013. 133 с.
 15. *Успенская В.И.* Экология и физиология питания пресноводных водорослей: М.: Изд-во МГУ, 1966. 124 с.
 16. *Инатова В.И.* Влияние размера популяции тест-объекта *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb. на результаты биотестирования // Вопр. совр. альгологии. 2017. № 1(13). С. 8.
 17. *Franklin N.M., Stauber J.L., Apte S.C., Lim R.P.* Effect of initial density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays // Environ. Toxicol. Chem. 2000. V. 21. P. 742–751.
 18. *Vasseur P., Pandard P., Burnel D.* Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum* // Toxic Assess. 1988. V. 3. P. 331–343.
 19. *Шавырина О.Б.* Токсичность меди для культуры зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* при флуктуациях уровня активной реакции среды (pH) // Международ. журн. прикл. и фундамент. исслед-й. 2016. № 4-4. С. 741–743.
 20. *Марушкина Е.В.* Исследование состояния популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* в норме и при интоксикации методом микрокультур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, Биол. фак-т. 2005. 21 с.
 21. The Merck Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976. 351 p.
 22. *Карякин Д.О., Мальцевская Н.В., Новичева М.В., Кулабухов В.Ю.* Оптимизация питательной среды для культуры *Scenedesmus* sp. // Международ. научн.-исслед. журн. 2017. № 8(62). Ч. 2. С. 10–15.

Influence of Algicides on the Growth Characteristics of the Micro-Alga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb.

A. V. Limantsev^{a, #}, M. V. Bidevkina^a, and M. V. Matrosenko^a

^aScientific Research Disinfectology Institute of Federal Service in Supervision of Protection of Rights of Consumers and Prosperity of a Man,
Nauchniy proezd 18, Moscow 117246, Russia

[#]E-mail: info@niid.ru

The influence of two algicides (benzalkoniya chloride and trichloroisocyanuric acid) on the micro-alga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb. is investigated. The high efficiency of the multiplication cells micro-alga suppression in the culture is shown. Differences in the toxic action of these substances are revealed. The possible reasons for these differences are discussed.

Key words: *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb., micro-alga, algicides, biocides, isocyanuric acid, trichloroisocyanuric acid, benzalkoniya chloride.