

*На правах рукописи*

САФИУЛЛИНА ЛИЛИЯ МУНИРОВНА

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОЧВЕННОЙ ВОДОРΟΣЛИ  
*EUSTIGMATOS MAGNUS* (В.РЕТЕРСЕН) НИББЕРД (*EUSTIGMATOPHYTA*) ПОД  
ВЛИЯНИЕМ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

Специальность 03.00.16. – экология, 03.00.05. - ботаника

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа – 2009

Работа выполнена на кафедре ботаники, биоэкологии и ландшафтного проектирования ГОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им.М.Акумлы»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук,  
профессор Кабиров Рустэм Расхатович

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук,  
профессор Усманов Искандер Юсуфович  
  
доктор биологических наук,  
профессор Домрачева Людмила Ивановна

**Ведущая организация:** Учреждение Российской Академии Наук  
Биолого-почвенный институт ДВО РАН

Защита диссертации состоится «6» ноября 2009 г. в 16<sup>00</sup> часов на заседании Объединённого диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69. Тел./факс (3472) 35-53-62. E-mail: [ib@anrb.ru](mailto:ib@anrb.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии УНЦ РАН, текст автореферата размещён на сайте:

<http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm>

Автореферат разослан «5» октября 2009 г.

Ученый секретарь  
Объединенного диссертационного совета,  
Кандидат биологических наук, доцент



Р.В.Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Водоросли – древнейшие про- и эукариотические фотосинтезирующие организмы. Широкое распространение водорослей по всему земному шару в самых разнообразных местообитаниях является свидетельством их приспособленности к воздействию целого ряда экологических факторов.

Почвенные водоросли являются одной из экологических групп водорослей. Обитая в почве, они оказывают влияние на ее физико-химические свойства, участвуют в азотфиксации, и тем самым вносят весомый вклад в создание почвенного плодородия. Также неопределима роль водорослей для гетеротрофных организмов, которым они служат пищей. Имеются данные об использовании ряда видов почвенных водорослей в биоиндикации (Кабилов, 1995; Штина и др., 1998).

Вид *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd относится к числу наиболее распространенных видов отдела *Eustigmatophyta*. Для него отмечено 135 местонахождений на территории бывшего СССР (Алексахина, Штина, 1984), где он встречался в большинстве исследованных почв – от тундры до сероземов (Штина и др., 1981). Однако морфологические особенности вида в различных экологических условиях изучены не в полной мере и требуют дальнейшего исследования.

**Цель и задачи исследования.** Цель наших исследований заключалась в изучении морфологической изменчивости почвенной водоросли *E.magnus* под влиянием экологических факторов. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Обобщить данные литературы об экологии, географическом распространении *E.magnus* и изучить вопросы внутривидовой морфологической изменчивости водоросли.
2. Выделить изоляты *E.magnus* из различных местообитаний и изучить их морфологическую изменчивость.
3. Оценить влияние экологических факторов (рН среды, температура, тяжелые металлы, удобрения) и установить границы сохранности морфологического статуса *E.magnus*.
4. Провести сравнительный анализ морфологии изолятов *E.magnus* с диагнозом вида в определителях.

**Научная новизна.** Выявлено, что при длительном (свыше 2 месяцев) культивировании все изоляты *E.magnus* изменяют морфологический статус. Впервые было проведено широкое исследование морфометрических признаков *E.magnus* при лабораторном культивировании. Изучено влияние основных экологических факторов на морфологию *E.magnus*. Установлены экологические границы сохранности морфологического статуса вида. Обнаружено появление атипичных морфологических изменений вегетативных клеток под действием изученных экологических факторов.

**Практическая значимость работы.** В результате исследования были выделены изоляты *E.magnus* из разных местообитаний. Обнаружено существование различных клеток *E.magnus*, имеющих морфологический статус, сходный с видами родов *Vischeria* и *Ellipsoidion*. Это следует учитывать при идентификации видов рода *Eustigmatos* по морфологическим признакам. Полученные в ходе исследования данные о существовании различных морфологических статусов *E.magnus* расширяют знания о морфологической изменчивости низших растений, в том числе и водорослей. Сведения о границах устойчивости *E.magnus* к экстремальным экологическим факторам и довольно высокая чувствительность к их воздействию позволяет рекомендовать данный вид для использования в системе биомониторинга. Материалы диссертации могут быть использованы в лекционных и специальных курсах по экологии, альгологии, систематике низших растений, методам оценки качества окружающей среды в высших учебных заведениях.

**Апробация.** Основные положения диссертации докладывались на: III Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Харьков, 2005); International Conference «Algae in terrestrial ecosystems» (Канив, 2005); Всероссийской научно-практической конференции «Уралэкология: Природные ресурсы – 2005». (Уфа-Москва,

2005); The 25th International Phycological Conference «Algae and their changes over time» (Poland, 2006); Международной научно-практической конференции «Гуманистическое наследие просветителей в культуре и образовании» (Уфа, 2007); Международной научно-практической конференции «История и современные проблемы ботанических исследований» (Одесса, 2008); XII съезд Русского ботанического общества «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века», (Петрозаводск, 2008); National Symposium on «Diversity and functionality of plant and microbes» (India, 2009); The 28th International Phycological Conference "Algal biodiversity in ecosystems of protected areas" (Poland, 2009); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы охраны почв, биологического разнообразия и здоровья человека в условиях трансформированной среды обитания», (Оренбург, 2009); II Всероссийской научно-практической конференции «Водоросли: Проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге», (Сыктывкар, 2009).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из которых 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК МОН РФ.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, вывода, списка литературы (189 наименований, в том числе 133 на русском, 56 на иностранных языках) и приложения. Общий объем работы составил 153 страницы, в том числе 102 страницы основного текста, 12 таблиц, 37 рисунков.

## ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭКОЛОГИЯ *EUSTIGMATOS MAGNUS* (B.PETERSEN) HIBBERD (*EUSTIGMATOPHYTA*) (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В главе рассматривается общая характеристика отдела, обосновывается выделение его в самостоятельный отдел, дается таксономический статус по современной номенклатуре, описывается история изучения вида *E.magnus* с изложением их диагнозов (Pascher, 1939; Дедусенко-Щеголева, Голлербах, 1962; Матвієнко, Догадіна 1978; Ettl, Gartner, 1995). В главе подробно представлены особенности географического распространения вида. Обсуждаются методические аспекты изучения видов водорослей и их морфологическая изменчивость. Проанализирован обширный объем информации по проблемам изучения экологии вида *E.magnus*, где рассматриваются вопросы влияния естественных и техногенных факторов: температуры, реакции среды, тяжелых металлов, орошения и сельскохозяйственной обработки, полимеров, гербицидов, поверхностно-активных веществ, минеральных удобрений, нефти и нефтепродуктов, радиации.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований были изоляты водоросли *E.magnus*, выделенные из почв различных регионов России и зарубежных государств. Всего было изучено 6 изолятов этого вида: «Байкал» - выделен из пробы почвы с территории Фролихинского государственного охотничьего заказника (Республики Бурятия); «Аркаим» - выделен из пробы почвы, отобранной на горе Грачиная сопка заповедника «Аркаим» (Челябинская область); «Гадельша» - выделен из пробы почвы на территории Баймакского района РБ; «Агробиостанция» - выделен из пробы с территории агробиостанции БГПУ им.М.Акмуллы Чишминского района РБ. Названия изолятов были даны по названию местности, откуда они были выделены. Кроме того, в коллекции культур водорослей кафедры ботаники БГПУ им.М.Акмуллы имеется штамм *E.magnus* CALU 11, полученный из коллекции культур водорослей лаборатории микробиологии БиНИИ ЛГУ (Санкт-Петербург) и изолят Петра Романенко, выделенный им из почв Франции («Франция»).

Для наблюдения вида в культуре и в экспериментах по влиянию экологических факторов использовали изолят «Байкал». В экспериментах на выявление полиморфизма в клетках *E.magnus* использовали все имеющиеся изоляты *E.magnus*.

Культуры выращивали на косяках и чашках Петри с использованием жидкой и агаризованной питательной среды Бристоль и Болда в модификации Голлербаха (Голлербах, Штина, 1969; Штина, Голлербах, 1976).

Жизненный цикл водоросли изучали на примере изолята «Байкал», который культивировали на агаризованной питательной среде Громова №6 в чашках Петри. Проводили 3 просмотра: первый – через 14 суток после пересадки, второй и третий – через 28 и 42 соответственно. При каждом просмотре измеряли диаметр 100 вегетативных клеток (всего 300 измерений).

Для наблюдения морфологических изменений водоросли культивировали на протяжении двух месяцев. В этом эксперименте всего было изучено 5 изолятов *E.magnus*. Измеряли по 50 клеток каждого статуса во всех изолятах. Всего в ходе этого эксперимента изучено 750 особей. Для статусов «*Vischeria*» и «*Eustigmatos*» измеряли диаметр клеток, для статуса «*Ellipsoidion*» – длину и ширину клеток.

В эксперименте по влиянию экологических факторов испытания проводились в жидких питательных средах Громова №6 и Болда. Токсиканты добавляли в питательную среду (Кабиров, 1995).

Для выявления изменений, происходящих в клетках *E.magnus* под воздействием изученных факторов, измеряли диаметр клеток, описывали морфологические нарушения, а также состояние протопласта. В экспериментах было изучено влияние на *E.magnus* таких

экологических факторов, как реакция среды (в диапазоне от 2 до 12 с интервалом 0,5) и положительные температуры (в диапазоне  $t=20^{\circ}-100^{\circ}\text{C}$  с интервалом в  $10^{\circ}\text{C}$  в первой серии опытов, и в диапазоне  $t=24^{\circ}-66^{\circ}\text{C}$  с интервалом в  $2^{\circ}\text{C}$  во второй серии опытов). Испытания проводились с использованием жидкой питательной среды Громова №6. Для анализа влияния техногенных нагрузок на *E.magnus* в качестве загрязняющих веществ использовали удобрения (мочевина:  $2 \times 10^{-3}$ ,  $8 \times 10^{-3}$ ;  $2 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-1}$ ,  $8 \times 10^{-1}$ , 1,7; хлорид калия в концентрациях  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $3 \times 10^{-1}$ , суперфосфат:  $4 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ;  $4 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  моль/л). Так же был проведен ряд экспериментов по выявлению устойчивости почвенной водоросли *E.magnus* к тяжелым металлам. Изучали влияние нитратов меди, железа, кадмия, никеля и кобальта на морфологические признаки водоросли. Испытывали концентрации  $1 \times 10^{-10}$ - 1 моль/л. Расчет концентраций токсикантов производили по действующему веществу.

Во всех градациях факторов измеряли диаметр 50 вегетативных клеток. В экспериментах было проанализировано 6 450 клеток *E.magnus*. Все измерения проводили с помощью светового микроскопа Биомед (объектив  $\times 40$ , апертура 0,65) при помощи окуляр-микрометра С15Х. Микрофотографии выполнялись с использованием фотоаппарата Canon А95 с фотонасадкой при увеличении 40 (апертура 0,65). Диаметр клеток измеряли в микрометрах (мкм).

При статистической обработке результатов исследований использовались средняя арифметическая, её ошибка, медиана, стандартное отклонение и значение коэффициента вариации (Плохинский, 1970; Лакин, 1990). Для оценки уровня изменчивости на основании коэффициента вариации использовалась шкала А.С.Мамаева (1968), согласно которой выделяют 3 уровня изменчивости, отражающие разнообразие растительных организмов: 1) пониженный коэффициент вариации ( $cv < 15\%$ ); 2) средний ( $cv = 15-25\%$ ); 3) повышенный ( $cv > 25\%$ ). Достоверность результатов исследований определялась с помощью критерия Стьюдента (Урбах, 1963; Лакин, 1990). Статистическую обработку результатов проводили в программном продукте базового пакета Statistica 6.0 for Windows.

## ГЛАВА 3. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *EUSTIGMATOS MAGNUS*

### 3.1. Наблюдение в культуре

Согласно данным литературы, время культивирования может влиять на морфологию водорослей (Гайсина, 2000). В ходе исследования влияния времени культивирования на диаметр клеток *E.magnus* на 14 сутки были обнаружены клетки от 6,8-11,9 мкм в диаметре (рис. 1). Вегетативные клетки *E.magnus* имели яркую желто-зеленую окраску, морфология которых не отличалась от диагноза вида. При этом наблюдался процесс автоспорообразования.

На 28 сутки культивирования у некоторых особей наблюдалось увеличение размеров вегетативных клеток (до 17 мкм) за счет образования крупных вакуолей, что, возможно, связано со старением культуры.

На 42 сутки вегетативные клетки уменьшались в диаметре, при этом доля клеток размером 8,5 мкм резко увеличилась. Наблюдалось изменение морфологических признаков водоросли, выражающееся в грануляции протопласта и обесцвечивании хлоропластов. Возможно, это связано с переходом водорослей в состояние метаболического покоя.

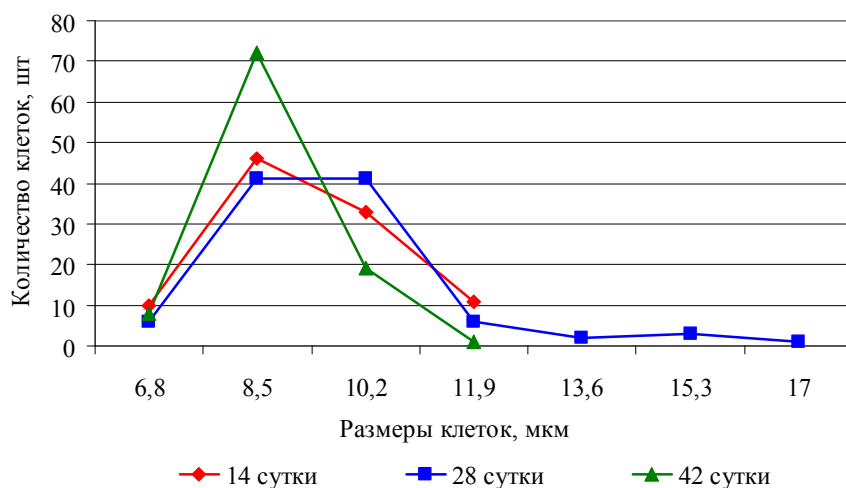


Рис. 1. Спектр морфометрических показателей при культивировании *E. magnus*

### 3.2. Морфологическая изменчивость изолятов *E. magnus*

При длительном (свыше 2 месяцев) культивировании 5 различных изолятов *E. magnus* наблюдалось явление морфологической изменчивости: шаровидные клетки *E. magnus* (рис. 2) приобретали выступы и становились похожими на клетки *Vischeria* (рис. 3). Другие клетки *E. magnus* вытягивались в длину и приобретали вид клеток *Ellipsoidion* (рис. 4). Вышеперечисленные видоизменения были характерны для всех изолятов *E. magnus*. После окончания эксперимента водоросли были пересеяны в свежую питательную среду Громова №6 и выращивались в обычных условиях в течение двух недель. При дальнейшем просмотре на свежей питательной среде в наблюдаемых культурах были обнаружены только типичные для *E. magnus* клетки.

Результаты молекулярно-генетических исследований подтверждают высокую степень родства *Eustigmatos* и *Vischeria* (Andersen и др., 1998). В связи с тем, что эти роды имеют к тому же большое сходство морфологических признаков (наличие как сферических клеток, так и клеток неправильной формы), а также очень похожи на всех стадиях жизненного цикла, возможно объединение этих родов в один общий. Эту же точку зрения разделяют и другие исследователи (Neustupa, Němcová, 2005). Однако для этого необходимо дальнейшее изучение родов *Eustigmatos* и *Vischeria* на морфологическом, цитологическом и молекулярно-генетическом уровнях.

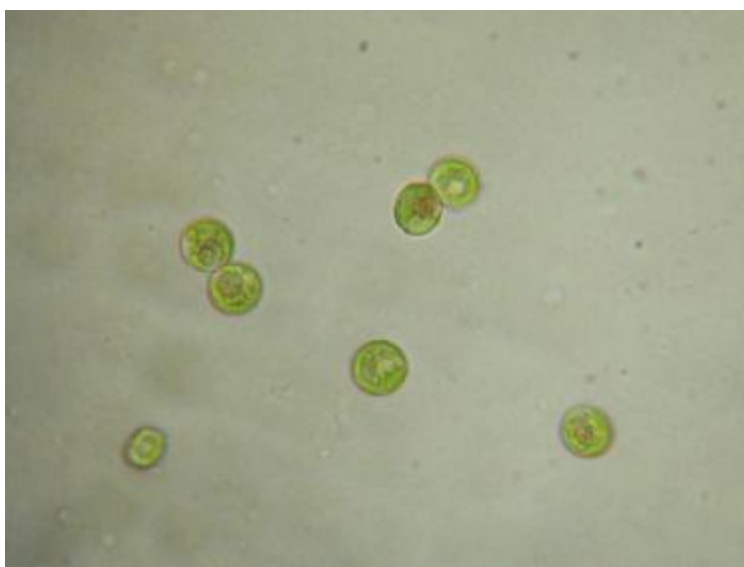


Рис. 2. *E. magnus* (обычный морфологический статус - шаровидные клетки) ( $\times 560$ )

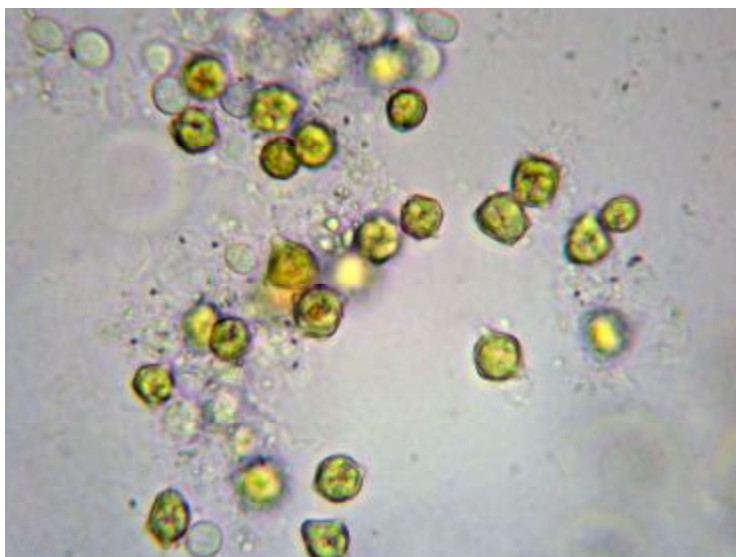


Рис. 3. *E. magnus* (морфологический статус «*Vischeria*» – клетки с выступами) (×560)

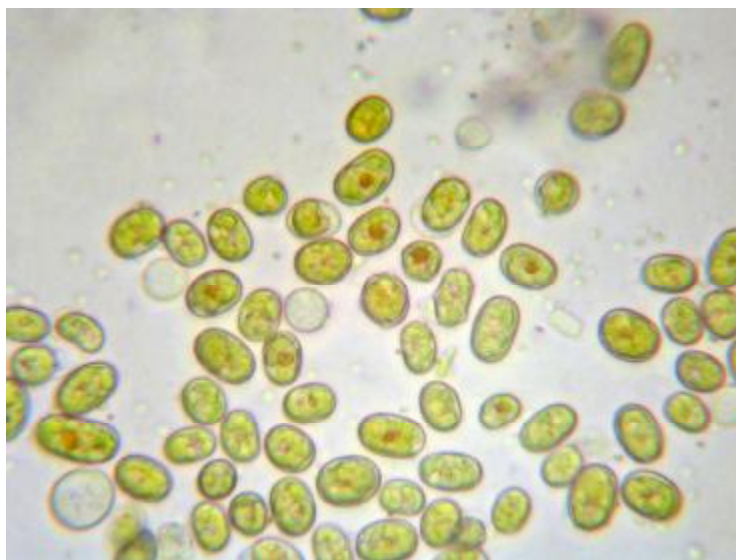


Рис. 4. *E. magnus* (морфологический статус «*Ellipsoidion*»– эллипсоидные клетки) (×560)

Эксперимент показал, что в одном изоляте могут встречаться клетки всех статусов одновременно, что создает впечатление наличия в культуре трех разных видов. Поэтому при определении видов необходимо учитывать время культивирования, так как есть вероятность ошибочного определения *Eustigmatos magnus* как представителей рода *Vischeria* и *Ellipsoidion*.

#### **ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *EUSTIGMATOS MAGNUS***

##### **4.1. Реакция среды**

Было изучено влияние значений pH на диаметр клеток *E. magnus* в диапазоне от 2 до 12 с интервалом 0,5. Контролем служила жидкая питательная среда (pH=6). В работе использовали 0,1n растворы HCl и NaOH. Измерения проводили с помощью pH-метра марки «pH Метр 744».

В ходе эксперимента, при pH=2 и pH=11-12 наблюдалось полное разрушение клеточного содержимого. При pH=2,5-4 погибло 20-90% клеток, при этом наблюдалось обесцвечивание и выход протопласта наружу. Однако часть клеток сохраняла целостность клеточных оболочек, и было возможно произвести измерение диаметра водоросли. В



диапазоне рН от 4,5 до 8,5 морфология клеток не изменялась. При рН=9-10,5 произошла грануляция 30-80% клеток *E. magnus*, которые приобретали бледно-желтый протопласт.

На основании средней арифметической диаметра клеток *E. magnus* была построена лепестковая диаграмма, где по осям ординат откладывали размерные признаки водоросли в мкм (рис. 5). Как видно, наибольшее влияние оказало значение рН=9,5, которое выразалось в увеличении размеров клеток. При рН=4,5 диаметр клеток уменьшился до 7,7мкм. При рН=5-7 морфометрические показатели водоросли оставались стабильными. Морфологических нарушений в данном интервале рН обнаружено не было.

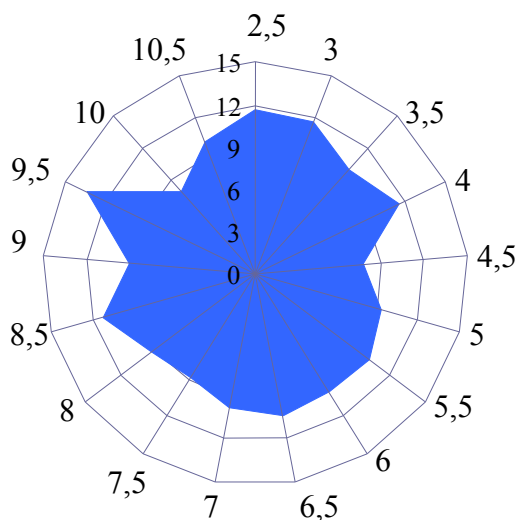


Рис. 5. Влияние реакции среды на диаметр клеток *E. magnus*

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что диапазон толерантности вида к рН среды находится в зоне кислых и нейтральных значений реакции среды. Полученные результаты подтверждаются данными предыдущих исследований, которые свидетельствуют о том, что *E. magnus* способен развиваться при слабо кислой и нейтральной реакции среды. Жизнедеятельность водоросли в свою очередь изменяет рН среды, приближая ее к нейтральной (Голлербах, 1936).

#### 4.2. Температура

Эксперимент состоял из двух серий: в первой серии суспензию культуры в пробирках подвергали 20 минутной экспозиции в термостате U-2 (GDR) при  $t=20-100^{\circ}\text{C}$  с интервалом  $10^{\circ}\text{C}$ . Просмотр культуры производился на 3, 6, 14, 18 и 21 сутки. Вторую серию эксперимента проводили после определения минимальной температуры, при которой наблюдались видимые признаки гибели водоросли. Нами было дополнительно исследовано влияние температур от  $24$  до  $66^{\circ}\text{C}$  с интервалом  $2^{\circ}\text{C}$ , просмотр проводили на 6 и 14 сутки.

В первой серии эксперимента морфологические нарушения проявлялись на 3-день просмотра и в дальнейшем усиливались.

На 3 сутки просмотра при воздействии температуры  $100^{\circ}\text{C}$  наблюдалось полное разрушение клеток водоросли. При воздействии  $t=80-90^{\circ}\text{C}$  гибель клеток обнаруживалась у 50-60% водорослей. При температурах  $60-70^{\circ}\text{C}$  погибали 40-45% клеток. В интервале температур  $60-90^{\circ}\text{C}$  наблюдалась грануляция протопласта, капли масла были практически не видны. При  $t=40-50^{\circ}\text{C}$  происходило изменение окраски протопласта с желто-зеленой на буроватую. При  $t=30-20^{\circ}\text{C}$  морфология клеток не изменялась. Размерные показатели водорослей в целом увеличивались по мере повышения температуры, что отражено на рисунке 6.

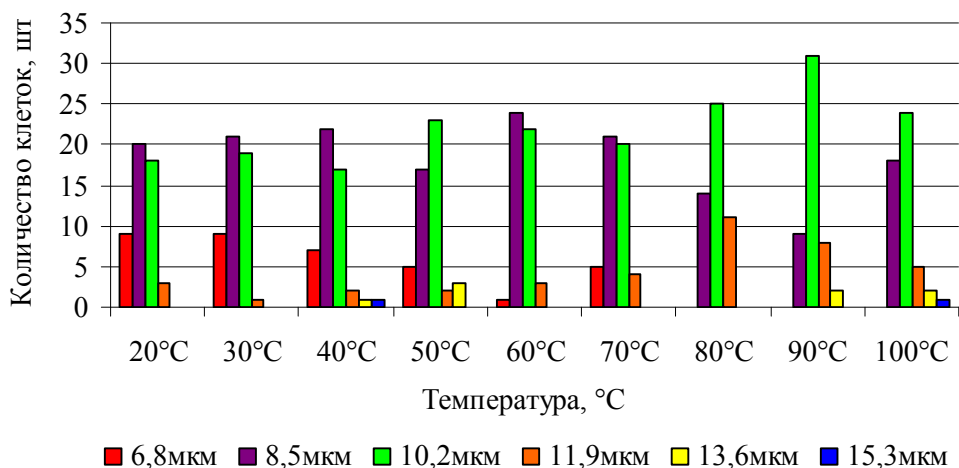


Рис. 6. Диаметр клеток *E.magnus* при нагревании на 3 сутки

На 6 сутки картина морфологических нарушений сохранялась. При  $t=30-40^{\circ}\text{C}$  начался процесс автоспорообразования. В остальных случаях общий характер воздействия температур на морфологию водоросли остался неизменным. Сильное укрупнение размеров некоторых водорослей (до 17мкм) произошло при  $t=30-40^{\circ}\text{C}$ , что, возможно, было связано с началом размножения водорослей.

На 14 сутки при  $t=60-90^{\circ}\text{C}$  наблюдалось полное обесцвечивание внутреннего содержимого клеток. При  $t=50^{\circ}\text{C}$  75% клеток погибали. Температура  $40^{\circ}\text{C}$  вызывала гибель 30% клеток. С повышением температуры расширялся спектр размерных признаков (рис. 7). Увеличение размерных показателей мы связываем с периодом размножения водоросли, так как вегетативные клетки не образовывали крупных вакуолей, имели типичную желто-зеленую окраску.

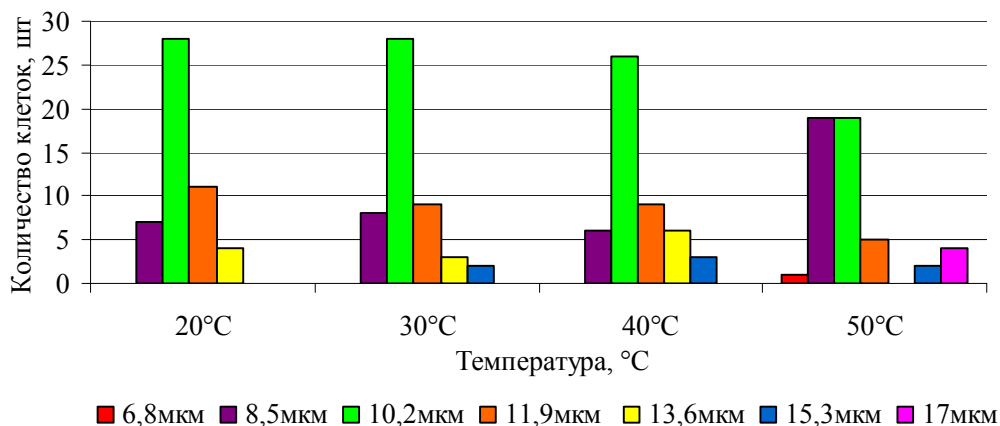


Рис. 7. Диаметр клеток *E.magnus* при нагревании на 14 сутки

На 18 сутки морфологические нарушения были те же, что и при предыдущем просмотре. В контроле, при  $20^{\circ}\text{C}$  количество клеток с диаметром от 8,5 до 11,9 было практически одинаковым. Укрупнение клеток до 17мкм было характерно для всех температурных интервалов. Клетки по морфологическим признакам имели характерный для данного вида облик.

На 21 сутки при  $t= 50-60^{\circ}\text{C}$  15-20% клеток были живыми. При  $t=40^{\circ}\text{C}$  у клеток *E.magnus* хлоропласт приобретал такой же вид, как у видов рода *Botrydiopsis* (многочисленные пристенные хлоропласты). В интервале температур от 20 до  $40^{\circ}\text{C}$

наблюдалось образование и выход автоспор размером 1,7-3мкм. Клетки диаметром 6,8мкм ни в одном из температурных диапазонов не обнаружены, но, как и в предыдущем просмотре, наблюдались клетки диаметром 17мкм (рис. 8). В данном просмотре вегетативные клетки некоторых водорослей образовывали крупные вакуоли, клеточная оболочка утолщалась, окраска водорослей приобретала буроватый цвет. Все вышеперечисленные изменения говорили о старении культуры.

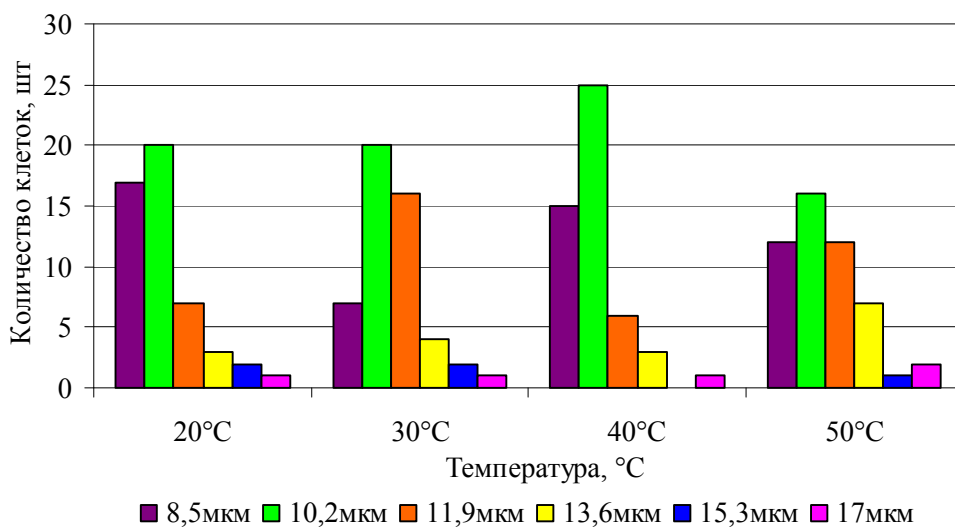


Рис. 8. Диаметр клеток *E. magnus* при нагревании на 21 сутки

В первой серии эксперимента во всех сроках просмотра в контроле (20°C) и при нагревании преобладали клетки диаметром 8,5-10,2мкм. Однако на более поздних сроках просмотра (18-21 сутки) доля клеток диаметром 11,9мкм увеличивалась, при этом крупные клетки диаметром 17мкм обнаруживались во всех вариантах опыта. Клетки размером 6,8мкм, встречающиеся на 3 и 6 сутки практически во всех температурных диапазонах, при более поздних просмотрах обнаруживались эпизодически. Увеличение диаметра клеток *E. magnus* связано не только с процессом размножения, т.е. образованием автоспор у водорослей, но и со старением культуры.

Во второй серии эксперимента наблюдения проводили на 6 и 14 сутки, поскольку именно эти временные интервалы давали наиболее полную картину влияния температуры, которая в дальнейшем оставалась неизменной.

На 6 сутки при  $t=54-66^{\circ}\text{C}$  происходило нарушение внутреннего содержимого клеток: протопласт у 50–70% водорослей отошел от клеточной стенки, также была отмечена грануляция (рис. 9). Температура  $52^{\circ}\text{C}$  вызывала образование очень крупных клеток (до 23,8мкм) (рис. 10). При  $t=50^{\circ}\text{C}$  наблюдался массовый выход зооспор (рис.11). В интервале температур от 42 до  $48^{\circ}\text{C}$  встречались атипические клетки *E. magnus* (рис. 12). Температура  $36-40^{\circ}\text{C}$  приводила к расчленению хлоропласта, как у видов рода *Botrydiopsis* (рис. 13). При нагревании в интервале от 24 до  $34^{\circ}\text{C}$  морфология клеток не изменялась (рис. 14).

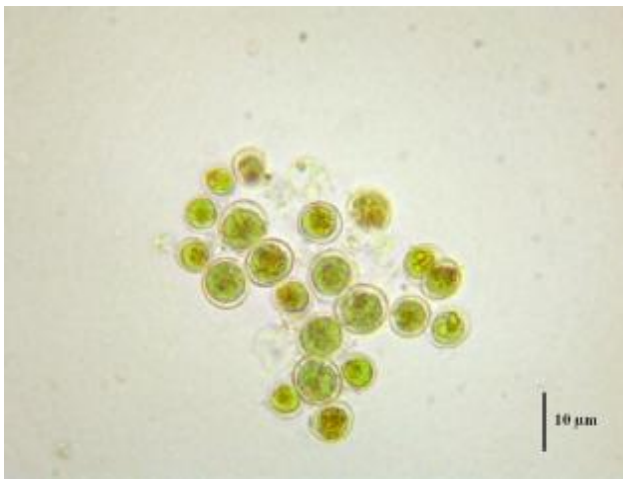


Рис. 9. Плазмолиз и грануляция в клетках *E. magnus* при  $t=54-66^{\circ}\text{C}$

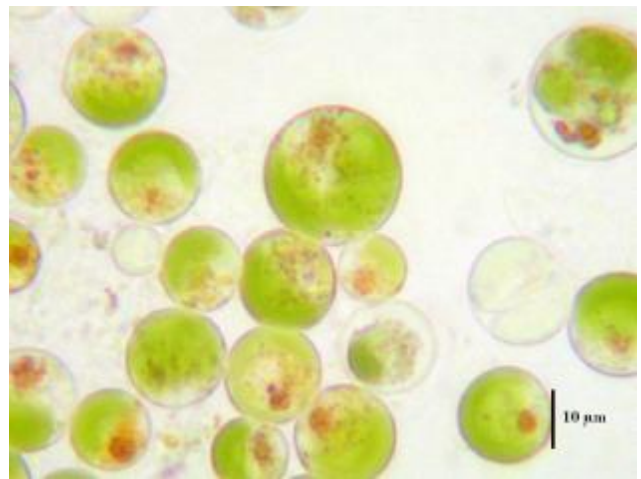


Рис. 10. Укрупнение клеток *E. magnus* в диаметре при  $t=52^{\circ}\text{C}$

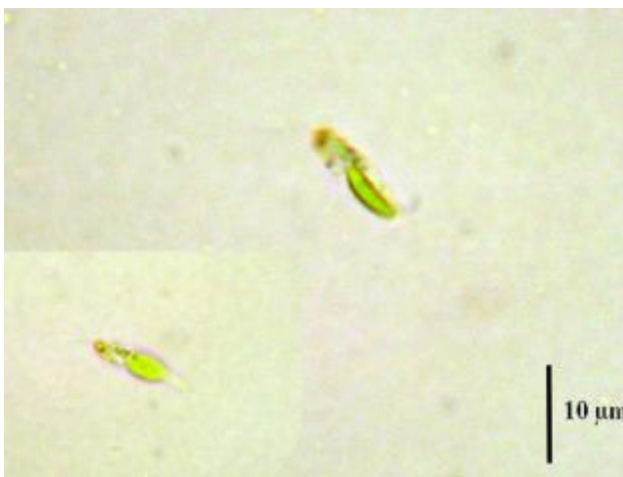


Рис. 11. Зооспоры *E. magnus* при  $t=50^{\circ}\text{C}$

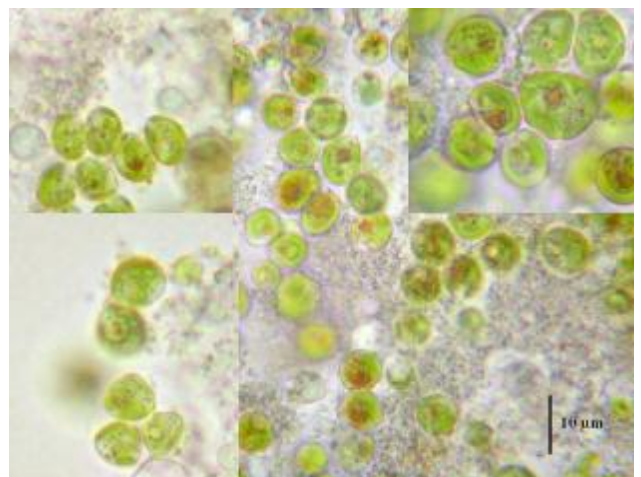


Рис. 12. Атипичные клетки *E. magnus* при  $t=42-48^{\circ}\text{C}$

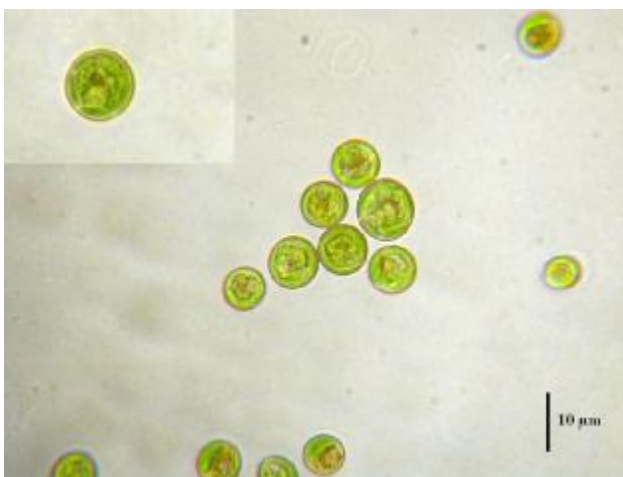


Рис. 13. Положение хлоропласта, схожее с видами рода *Botrydiopsis* при  $t=36-40^{\circ}\text{C}$

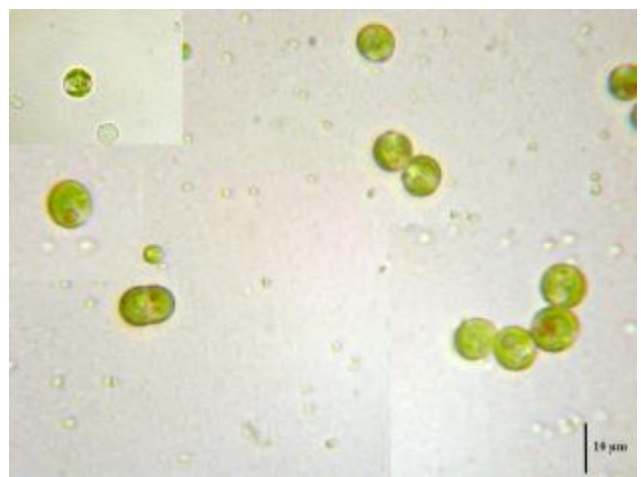


Рис. 14. Типичные клетки *E. magnus* при  $t=24-34^{\circ}\text{C}$

На 14 сутки наблюдали гибель клеток при  $56-66^{\circ}\text{C}$ : обесцвечивание хлоропласта наблюдалось у 90% клеток. При нагревании от 24 до  $34^{\circ}\text{C}$  морфология клеток была неизменной.

На основании значений средней арифметической диаметра клеток *E.magnus* и ее ошибки нами была построена гистограмма влияния температуры на морфометрические показатели водоросли во второй серии эксперимента по двум срокам просмотра на 6 и 14 сутки, где по осям откладываются размерные показатели водоросли (диаметр, мкм) и диапазон температур с интервалом в 2°C (рис. 15). На этом графике можно пронаблюдать зависимость размеров диаметра клеток *E.magnus* от определенной температуры. Так, по данным просмотра на 6 сутки видно, что в целом диаметр клеток водорослей увеличивался с повышением температуры. На 14 сутки при температурах 50-52°C наблюдалось небольшое увеличение клеток.

Таким образом, результаты данного эксперимента позволили определить границы устойчивости почвенной водоросли *E.magnus* к воздействию температуры, а так же пронаблюдать изменение морфологических и размерных признаков. *E.magnus* сохранял морфологический статус до 54°C включительно. Установлено влияние  $t=50^{\circ}\text{C}$  на процесс размножения водоросли. Температура 52°C выявляла наличие очень крупных клеток водорослей.

Проанализировав данные литературы по схожим экспериментам, нами был выстроен ряд, показывающий максимальную температуру, выше которой особи исследованных видов погибали: *Eustigmatos magnus* (*Eustigmatophyta*) (54°C) > *Hantzschia amphioxys* (*Bacillariophyta*) (50°C) (Фаздуддинова, 1999) > *Xanthonema exile* (*Xanthophyceae*) (48°C) (Гайсина, 2000) > *Cylindrospermum michailovskoënsë* (*Cyanoprokaryota*) (40°C) (Зарипова, 2009), *Nitzschia palea* (*Bacillariophyta*) (40°C) (Фаздуддинова, 1999), по которому видно, что изучаемый нами вид обладает наиболее высокой устойчивостью к данному экологическому фактору.

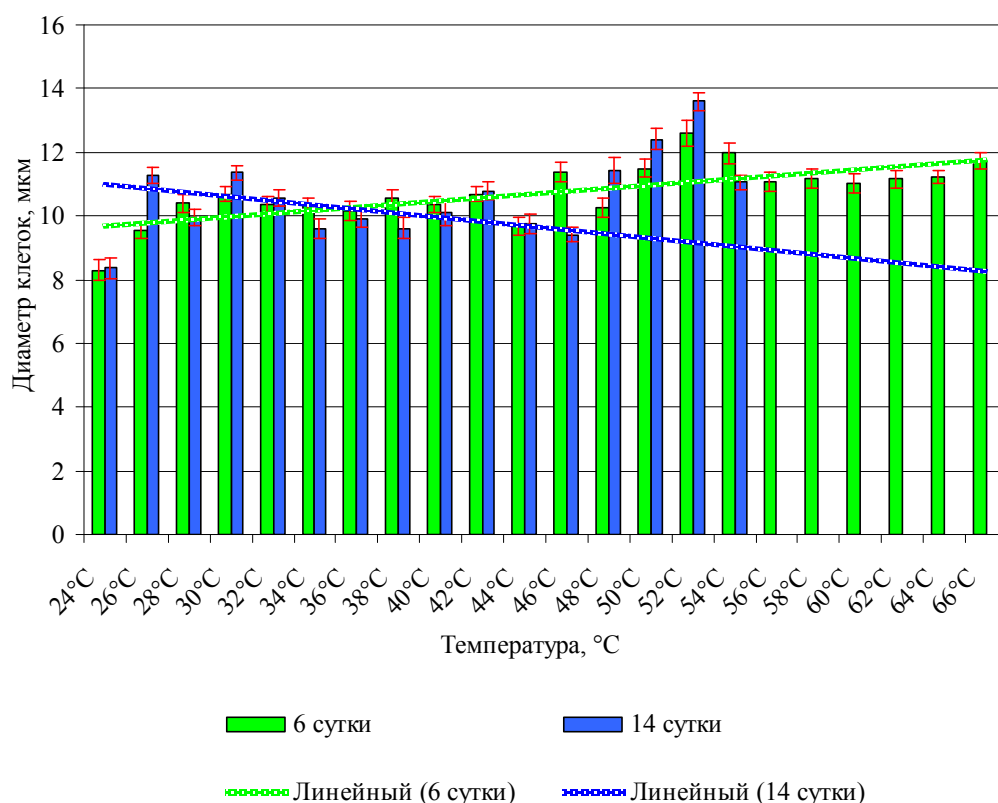


Рис. 15. Влияние температуры на диаметр клеток *E.magnus* во второй серии эксперимента

#### 4.3. Тяжелые металлы

Были изучены пределы устойчивости почвенной водоросли *E.magnus* к тяжелым металлам. Изучали влияние нитратов меди, железа, кадмия, никеля и кобальта на



морфологические признаки водоросли. Расчет концентраций производили по действующему веществу. Испытывали концентрации  $1 \times 10^{-10}$  - 1 моль/л металла. Эксперименты проводили в жидкой питательной среде Болда. Растворы солей разливали в пробирки, куда прокапывали по 0,01 мл культуры водоросли.

Установлено, что из пяти исследованных металлов наиболее токсичной была медь: гибель клеток *E.magnus* наблюдалась при концентрациях  $1 \times 10^{-3}$  моль/л и выше. Данные концентрации вызывали деформацию клеток, плазмолиз и полное обесцвечивание протопласта, что указывало на элиминацию водоросли (рис. 16). В концентрациях  $1 \times 10^{-4}$  и  $1 \times 10^{-5}$  моль/л капли масла сгруппировывались и образовывали темные пятна внутри вегетативных клеток, так же единично обнаруживались водоросли атипической формы (рис. 17). При  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  моль/л количество клеток с вышеперечисленными нарушениями постепенно уменьшалось. В концентрациях  $1 \times 10^{-8}$  -  $1 \times 10^{-10}$  моль/л наблюдалось автоспорообразование (рис. 18). На втором месте по токсичности оказалось железо: гибель клеток наступала при концентрациях от  $1 \times 10^{-2}$  моль/л и выше. Все концентрации данного металла приводили к деформации и изменению окраски хлоропласта с желто-зеленого на насыщенно зеленый цвет, при этом также в центре клеток наблюдались темные пятна из капель масла, хлоропласт располагался пристенно. Так же довольно часто можно было обнаружить клетки с крупными гранулированными вакуолями (рис. 19).

Менее токсичным металлом по отношению к *E.magnus* отказался кадмий, гибель клеток наступала при концентрациях от  $1 \times 10^{-1}$  моль/л и выше. Общая картина морфологических нарушений характеризовалась сильной грануляцией протопласта, концентрацией капель масла в виде бурых гранул или темных пятен, крупных вакуолей внутри вегетативных клеток, а так же обесцвечиванием хлоропласта (рис. 20). Из всех исследованных металлов наименьшее токсическое воздействие на почвенную водоросль *E.magnus* оказали соли никеля и кобальта. Элиминация водоросли произошла при концентрации 1 моль/л. С понижением концентраций при никеле наблюдалась уродливость (рис. 21), а при кобальте гигантизм вегетативных клеток, которые были не стабильны и быстро разрушались (рис. 22).

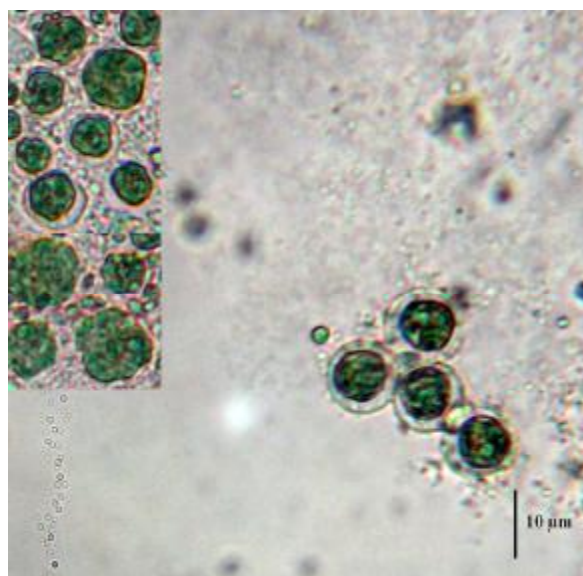


Рис. 16. Гибель клеток *E.magnus* при воздействии ионов меди в концентрациях  $1 \times 10^{-3}$  моль/л

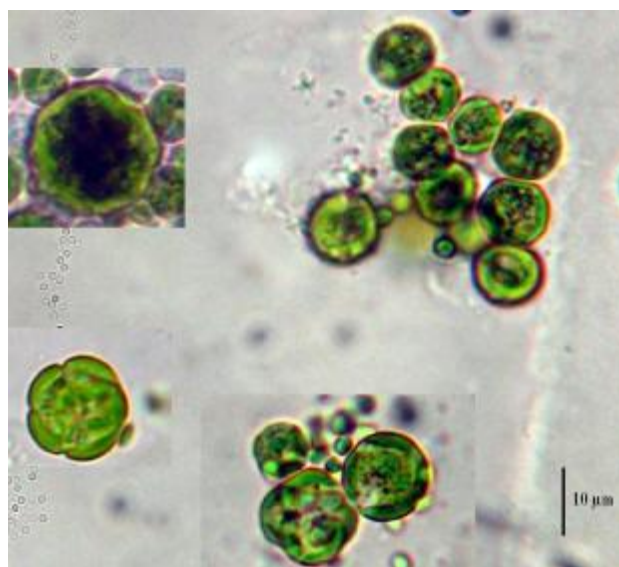


Рис. 17. Морфологические нарушения *E.magnus* под воздействием ионов меди в концентрациях  $1 \times 10^{-4}$  -  $1 \times 10^{-5}$  моль/л

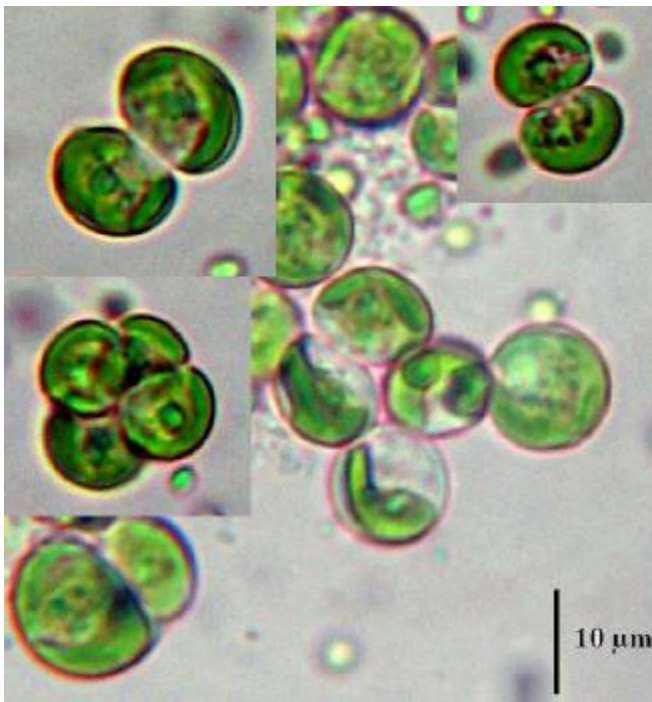


Рис. 18. Процесс автоспорообразования при концентрациях ионов меди  $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-10}$  моль/л

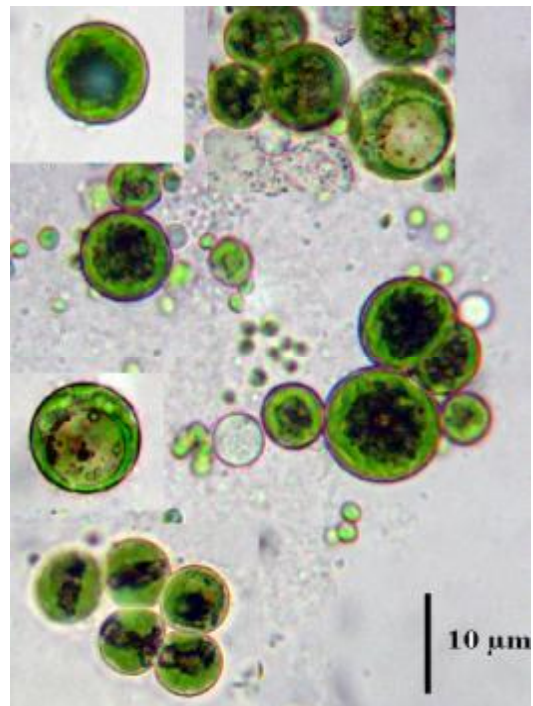


Рис. 19. Морфологические нарушения клеток *E. magnus* под воздействием ионов железа при концентрациях  $1 \times 10^{-3}$ - $1 \times 10^{-10}$  моль/л

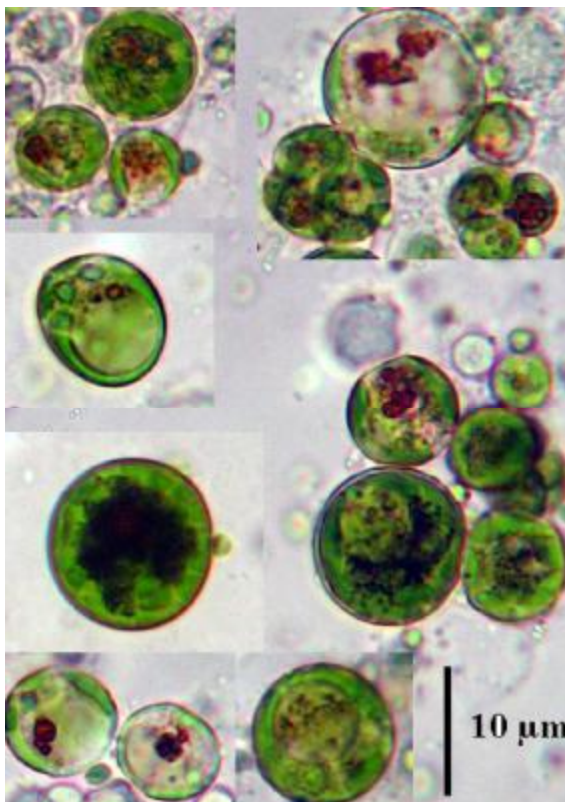


Рис. 20. Морфологические нарушения клеток *E. magnus* под воздействием ионов кадмия при концентрациях  $1 \times 10^{-2}$ - $1 \times 10^{-10}$  моль/л

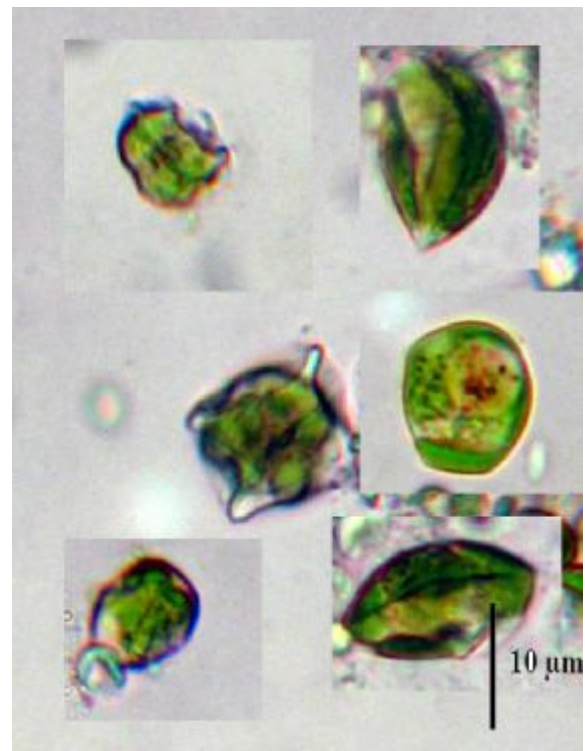


Рис. 21. Деформация клеток *E. magnus* под воздействием ионов никеля



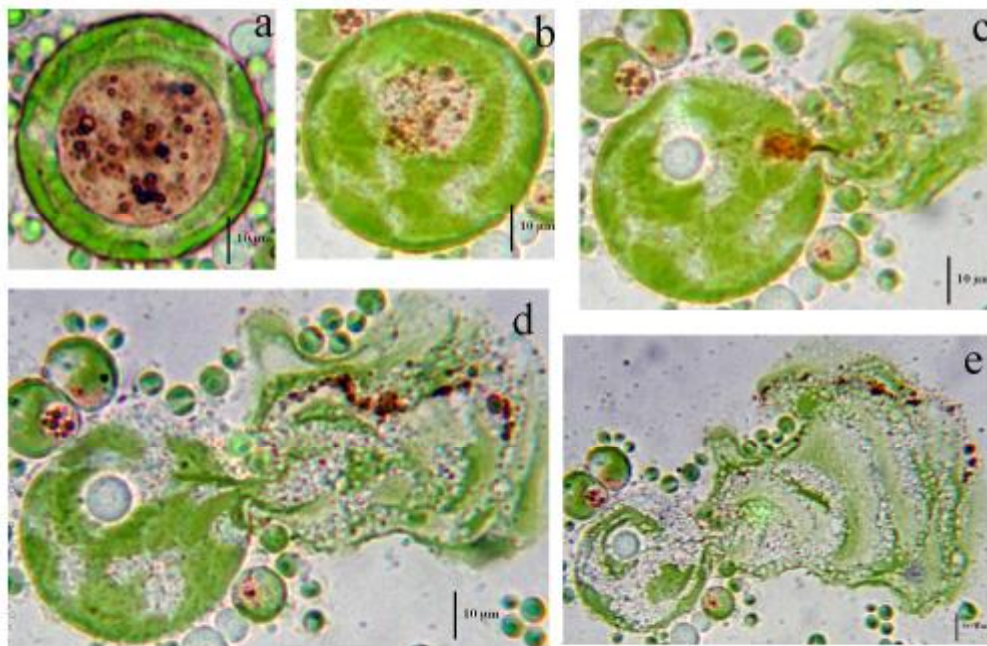


Рис. 22. Процесс разрушения клеточной целостности *E. magnus* под воздействием ионов кобальта (а-образование крупной вакуоли с гранулами масла; б- разрушение вакуоли; с- разрыв клеточной оболочки; д- выход протопласта наружу; е- полное разрушение клеточного содержимого)

При обобщении полученных результатов нами была построена лепестковая диаграмма, характеризующая степень воздействия изучаемых тяжелых металлов на устойчивость *E. magnus* (рис. 23). Наиболее токсичным металлом, вызывающим гибель клеток водоросли оказалась медь, на втором месте железо, потом кадмий и наименее токсичными оказались никель и кобальт.

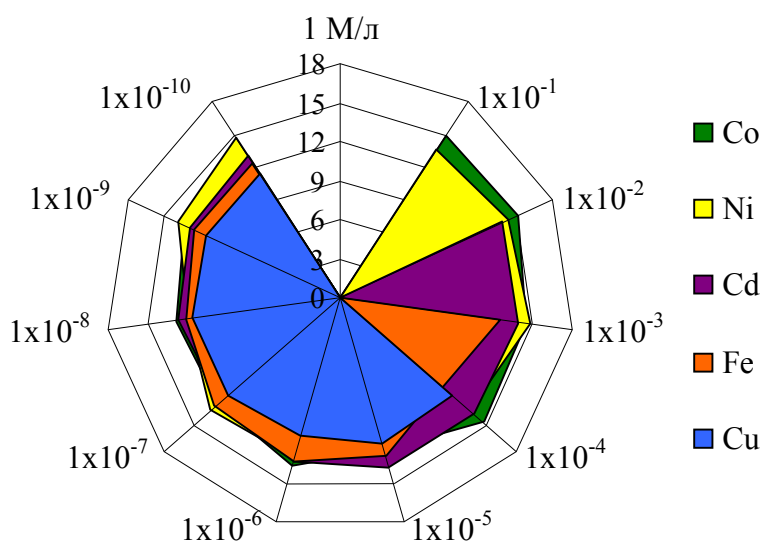


Рис. 23. Влияние ионов ТМ на устойчивость *E. magnus*

Результаты наших исследований показали, что по влиянию на морфометрические показатели *E. magnus* исследованные металлы имеют следующий ряд токсичности: Cu>Fe>Cd>Ni, Co. В целом действие ТМ негативно влияло на морфологические



характеристики клеток *E.magnus*, что выражалось в обесцвечивании и изменении окраски клеток, уменьшении размерных признаков водорослей, деформация и грануляции клеток.

#### 4.4. Удобрения

Проведены эксперименты по изучению влияния, мочевины, суперфосфата и хлорида калия на морфологические показатели *E.magnus*. Удобрения испытывали в следующих концентрациях (моль/л действующего вещества): мочевины -  $2 \times 10^{-3}$ ,  $8 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-1}$ ,  $8 \times 10^{-1}$ , 1,7; хлорид калия -  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $3 \times 10^{-1}$ ; суперфосфат -  $4 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  моль/л.

Установлен следующий ряд токсичности испытанных удобрений для *E.magnus*: суперфосфат > хлорид калия > мочевины. Концентрации суперфосфата  $2 \times 10^{-3}$ , хлорида калия  $3 \times 10^{-1}$  и мочевины  $8 \times 10^{-1}$  моль/л вызывали полное разрушение клеток водоросли.

Мочевина в концентрациях  $5 \times 10^{-1}$  и  $2 \times 10^{-1}$  моль/л приводила к сильной грануляции протопласта и деформации формы клеток, иногда можно было обнаружить клетки с едва заметным расчленением хлоропласта (рис. 24). При концентрации  $2 \times 10^{-2}$  моль/л атипичные и гранулированные клетки встречались единично, однако количество и степень расчлененности хлоропласта заметно увеличилось, а так же наблюдалось сгущение капель масла в клетках (рис. 25). При концентрациях  $8 \times 10^{-3}$  и  $2 \times 10^{-3}$  моль/л наблюдалось интенсивное развитие автоспор. При этом водоросли приобретали желто-зеленую окраску. Грануляции и нарушения морфологии клеток не наблюдалось (рис. 26). Возможно, данная концентрация стимулировала развитие водоросли *E.magnus*.

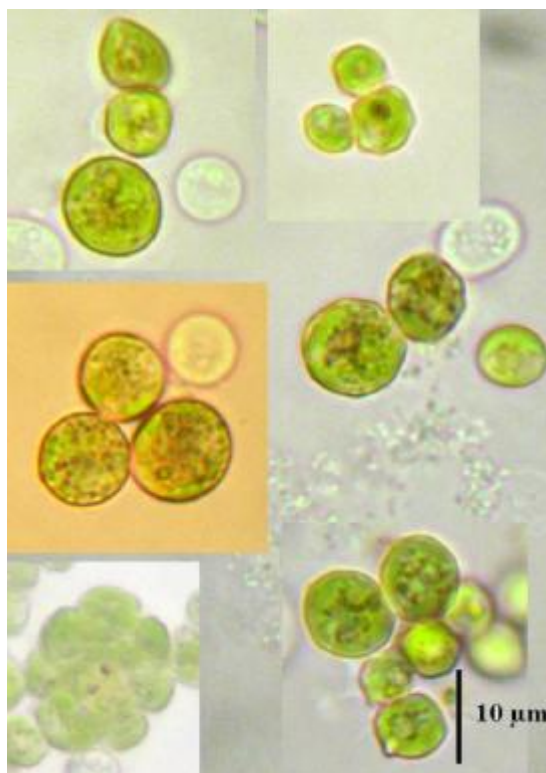


Рис. 24. Грануляция протопласта и деформация формы клеток *E.magnus* под воздействием мочевины при концентрациях  $5 \times 10^{-1}$  и  $2 \times 10^{-1}$  моль/л

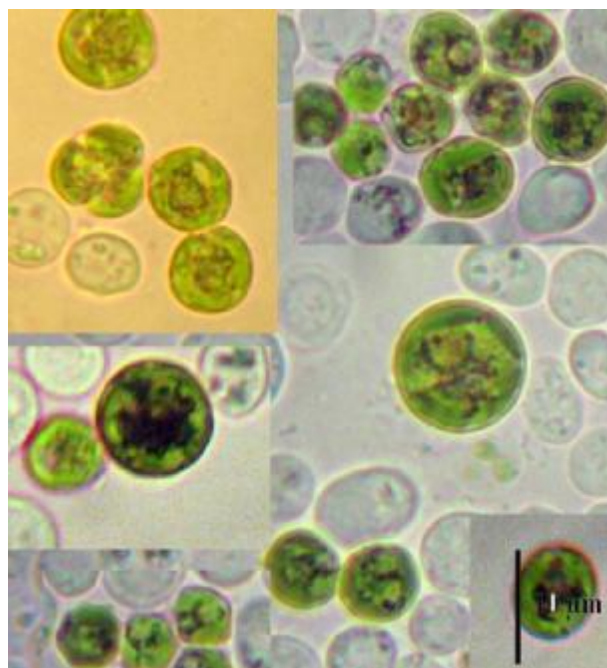


Рис. 25. Морфологические нарушения клеток *E.magnus* под воздействием мочевины при концентрации  $2 \times 10^{-2}$  моль/л

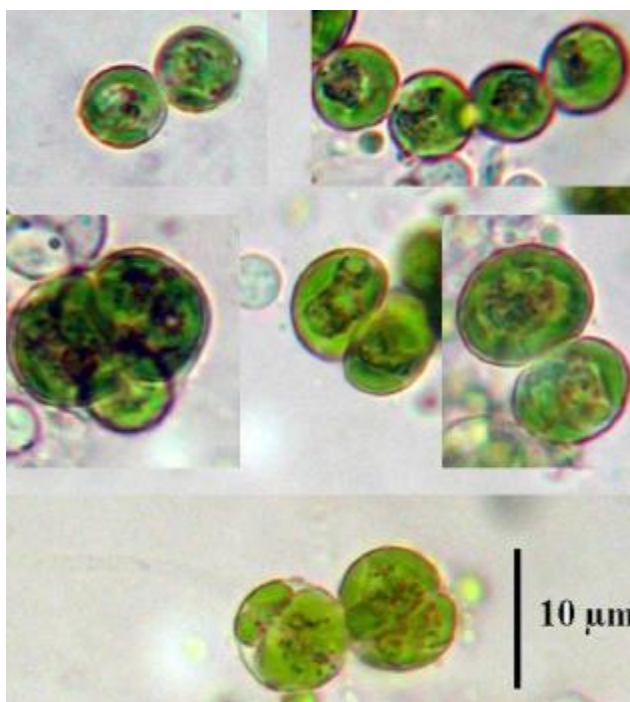


Рис. 26. Стимуляция процесса автоспорообразования *E. magnus* под воздействием мочевины при концентрациях  $8 \times 10^{-3}$  и  $2 \times 10^{-3}$  моль/л

Хлорид калия в концентрациях  $1 \times 10^{-1}$  и  $5 \times 10^{-2}$  моль/л вызывал грануляцию протопласта и деформацию формы клеток (рис. 27). Концентрация  $1 \times 10^{-2}$  моль/л так же вызывала грануляцию в клетках *E. magnus*. Данная концентрация приводила к образованию крупных вакуолей в клетках водоросли и расчленению хлоропласта (рис. 28). Концентрации  $5 \times 10^{-3}$  и  $1 \times 10^{-3}$  моль/л не вызвали морфологических изменений *E. magnus*. Стимуляции роста и развития водоросли при низких концентрациях данного удобрения обнаружить не удалось.

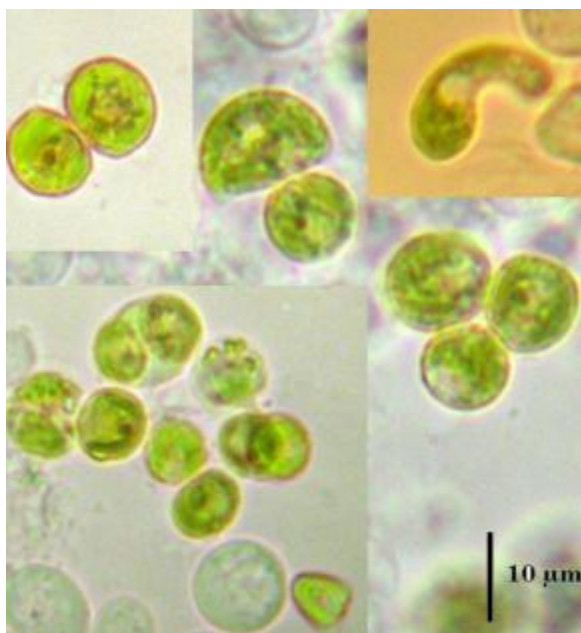


Рис. 27. Грануляция протопласта и деформация формы клеток *E. magnus* под воздействием хлорида калия при концентрации  $1 \times 10^{-1}$  и  $5 \times 10^{-2}$  моль/л

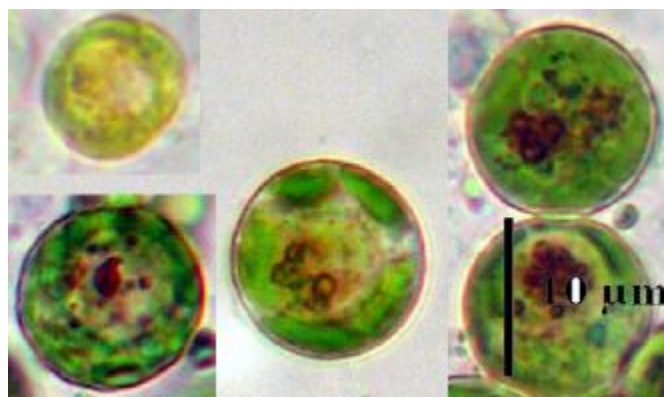


Рис. 28. Морфологические нарушения клеток *E. magnus* под воздействием хлорида калия при концентрации  $1 \times 10^{-2}$  моль/л

Суперфосфат в концентрации  $4 \times 10^{-4}$  моль/л приводил к деформации клеток *E. magnus*, а так же группированию водорослей с образованием толстой оболочки вокруг (рис. 29). Но уже в следующей концентрации ( $2 \times 10^{-4}$  моль/л) подобные явления не были обнаружены. Здесь наблюдалось обесцвечивание хлоропласта, атипичные и гранулированные клетки (рис. 30). При концентрации  $4 \times 10^{-5}$  моль/л морфологических нарушений не наблюдалось.

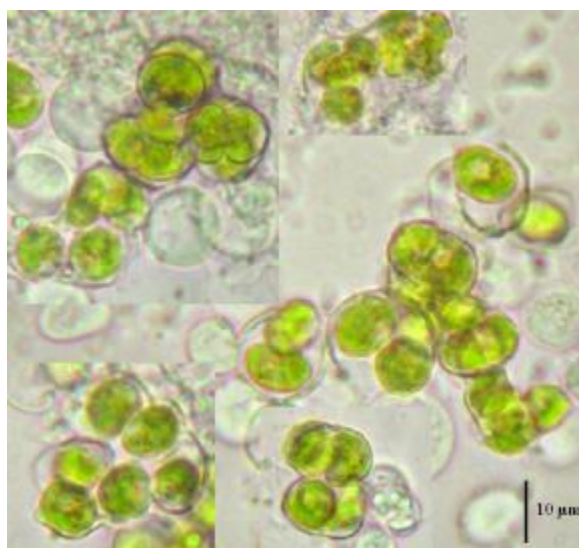


Рис. 29. Деформация клеток *E. magnus* под воздействием суперфосфата при концентрации  $4 \times 10^{-4}$  моль/л

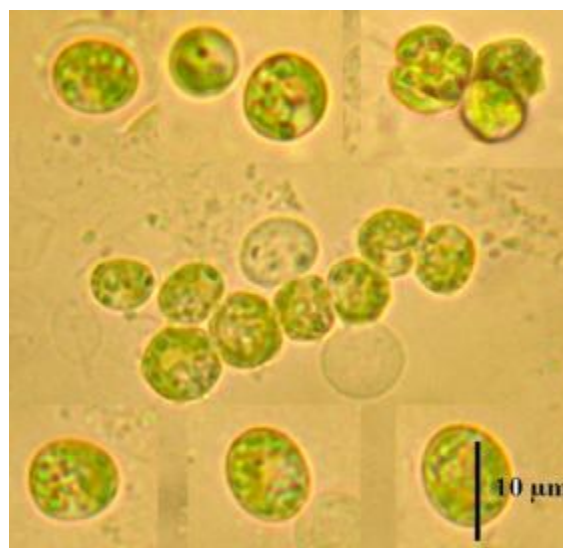


Рис. 30. Морфологические нарушения клеток *E. magnus* под воздействием суперфосфата при концентрации  $2 \times 10^{-4}$  моль/л

На основании значений средней арифметической диаметра клетки *E. magnus* были построены лепестковые диаграммы, демонстрирующие изменения морфометрических параметров при воздействии изученных удобрений (рис. 31, 32, 33). Из рисунков видно, что на 14 сутки воздействие всех удобрений на *E. magnus* привело к уменьшению размерных признаков водоросли. Исключение составили лишь концентрации  $2 \times 10^{-2}$  и  $2 \times 10^{-1}$  при мочеvine и концентрация  $2 \times 10^{-4}$  при суперфосфате.

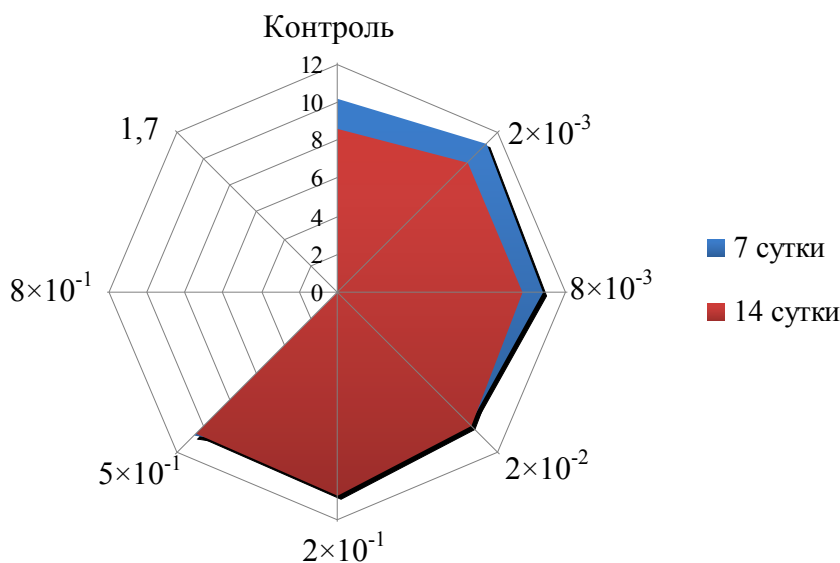


Рис. 31. Изменение диаметра клеток *E. magnus* при воздействии мочевины



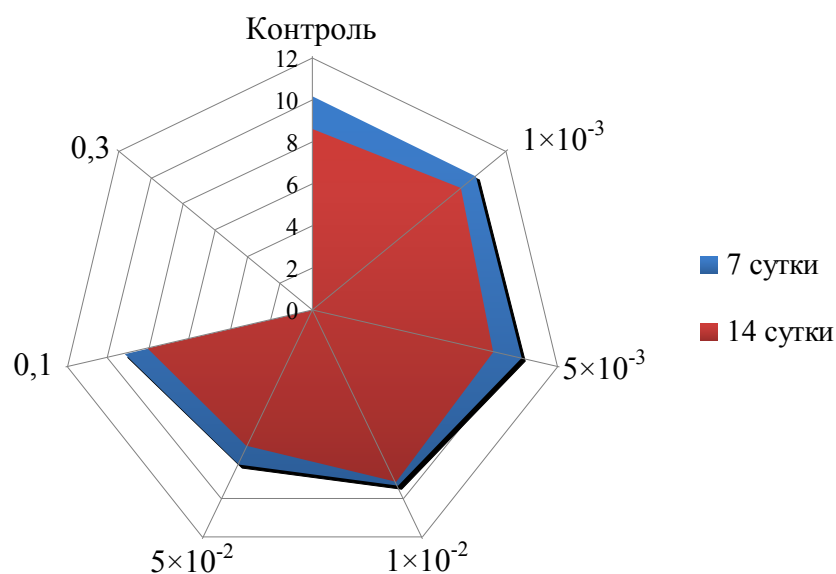


Рис. 32. Изменение диаметра клеток *E. magnus* при воздействии хлорида калия

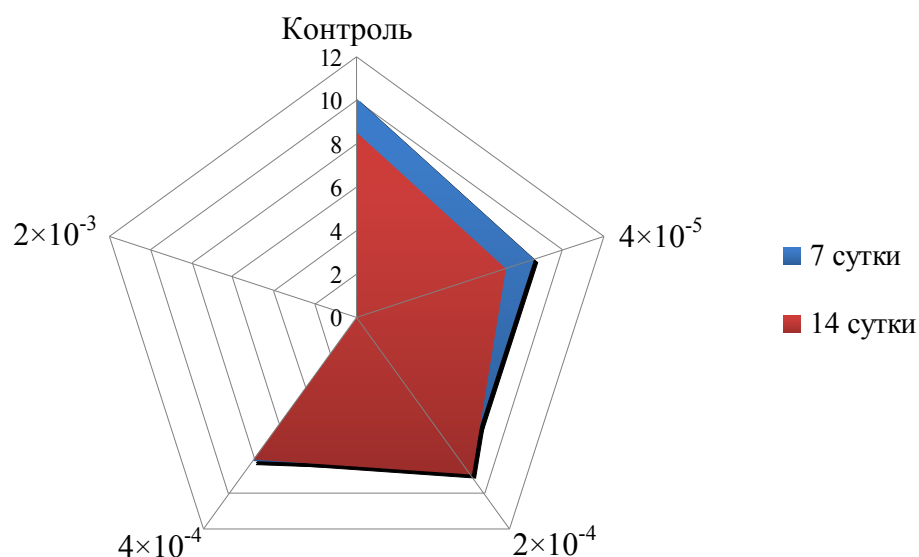


Рис. 33. Изменение диаметра клеток *E. magnus* при воздействии суперфосфата

## ВЫВОДЫ

1. *Eustigmatos magnus* характеризуется широким географическим распространением, что является свидетельством его экологической пластичности. В ходе проведенных исследований были выделены в культуру и исследованы изоляты водоросли из местообитаний, характеризующихся различными экологическими условиями – Республика Башкортостан, Челябинская область, Республика Бурятия, Франция.

2. Установлено, что при длительном культивировании *E. magnus* появлялись атипичные клетки, схожие по морфологии с клетками родов *Vischeria* и *Ellipsoidion*. Это обстоятельство необходимо учитывать при определении видовой принадлежности водорослей и внести полученные данные в диагноз вида *E. magnus*.

3. Определены границы устойчивости водоросли к температуре, реакции среды, тяжелым металлам и удобрениям. Вид сохранял морфологический статус при  $t=20-54^{\circ}\text{C}$ , и при  $\text{pH}=4,5-8,5$ . Пределы устойчивости *E. magnus* к воздействию тяжелых металлов: меди -  $1 \times 10^{-3}$  моль/л; железа -  $1 \times 10^{-2}$  моль/л; кадмия -  $1 \times 10^{-1}$  моль/л; никеля и кобальта - 1 моль/л.

Границы толерантности к влиянию удобрений: суперфосфата  $2 \times 10^{-3}$ ; хлорида калия  $3 \times 10^{-1}$ ; мочевины  $8 \times 10^{-1}$  моль/л

4. Установлен следующий ряд токсичности исследованных металлов:  $\text{Cu} > \text{Fe} > \text{Cd} > \text{Ni}$ ,  $\text{Co}$  и испытанных удобрений: суперфосфат > хлорид калия > мочевина для *E. magnus*.

5. Экстремальные значения экологических факторов вызывали разнообразные морфологические нарушения *E. magnus*, выражающиеся в грануляции и обесцвечивании цитоплазмы, появлении атипических и бесформенных клеток, разрушении клеточного содержимого. Анализ размерных признаков позволяет выявить даже небольшие изменения условий существования вида.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гайсина Л.А., Сафиуллина Л.М., Сугачкова Е.В., Мухаметова Г.М. Морфология *Eustigmatos magnus* (Boye-Pet.)Hibb. (*Eustigmatophyta*) при культивировании. // Растительные ресурсы: опыт, проблемы и перспективы. Материалы всероссийской научно-практической конференции. 20-22 января 2005 г. Бирск: Бирск. гос. пед. ин-т. 2005. 189 с.
2. Гайсина Л.А., Мухаметова Г.М., Сафиуллина Л.М. Экология почвенной водоросли *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) // Уралэкология: Природные ресурсы – 2005. Всероссийская научно-практическая конференция. Уфа-Москва. 2005. С.189-190.
3. Гайсина Л.А., Сафиуллина Л.М., Хайбуллина Л.С. Изменение размерных признаков микроскопической водоросли *Eustigmatos magnus* (Boye-Pet.)Hibb. (*Eustigmatophyta*) при культивировании. // Актуальные проблемы современной альгологии: Тез. докл. 3 Межд. конф. / Под ред. Т.В.Догадиной. Харьков. 2005. С. 32-33.
4. Сафиуллина Л.М. Влияние реакции среды на популяцию водоросли *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd // Проблемы геоэкологии Южного Урала. Материалы второй всероссийской научно – практической конференции Часть I Оренбург: ИПК ГОУ ОГУ, 2005. 269 с.
5. Gaisina L.A., Safiullina L.M. Influence of high temperature on morphology and biology of *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) // Algae in terrestrial ecosystems International Conference. Kaniv Nature Reserve, Kaniv, Ukraine, September 27-30, 2005. Nizhyn, 2005. P.30.
6. Gaisina L.A., Safiullina L.M., Khaibullina L.S. *Eustigmatos magnus* (B.Peter.) Hibb. (*Eustigmatophyta*) resistance to high temperatures // Algae and their changes over time. Proceedings of the 25th International Phycological Conference Poznan-Lagow-Stubice. 16-19 May 2006. 74p.
7. Гайсина Л.А., Мухаметова Г.М., Бакиева Г.Р., Сафиуллина Л.М. Значение микроскопических водорослей в биологическом образовании. // Гуманистическое наследие просветителей в культуре и образовании: Материалы Международной научно-практической конференции 13 декабря 2007г. Уфа: Издательство БГПУ. С.53-55.
8. Сафиуллина Л.М., Гайсина Л.А. Полиморфизм микроскопической почвенной водоросли *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) // Проблемы современной альгологии: Материалы Всероссийской школы-семинара, 7-9 октября 2008г., Уфа: РИЦ БашГУ, 2008. С. 12-14.
9. Кабиров Р.Р., Сафиуллина Л.М. Особенности экологии и распространения одноклеточной почвенной водоросли *Eustigmatos magnus* (*Eustigmatophyta*) в Южном Урале (Россия) // Альгология. Т.18. № 2. 2008.
10. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Сафиуллина Л.М., Пурина Е.С., Абузарова Л.Х., Кокорина Л.В., Мухаметова Г.М., Бакиева Г.Р. Влияние экстремальных экологических факторов на почвенные водоросли // Фундаментальные и прикладные

- проблемы ботаники в начале XXI века: Материалы XII съезда Русского ботанического общества, Петрозаводск. 22-27 сентября, 2008. С.23-26.
11. Абузарова Л.Х., Гайсина Л.А., **Сафиуллина Л.М.**, Бакиева Г.Р. Изменение морфологии *Cylindrospermum michailovskoense* (Cyanoprokaryota) при воздействии минеральных удобрений // Вестник ОНУ. Том 13. Выпуск 4. Одесса. 2008. С.55-60.
  12. **Сафиуллина Л.М.**, Бакиева Г.Р., Гайсина Л.А. Влияние мочевины на *Eustigmatos magnus* (В.Petersen) Hibberd D (*Eustigmatophyta*) // Растительные ресурсы: опыт, проблемы и перспективы: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции 20-21 марта 2009 г. Бирск: Бирск. гос. соц.-пед.акад., 2009. 204 с.
  13. L.A. Gaysina, E.S. Purina, **L.M. Safiullina**, G.R. Bakieva. Resistance of *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva, Mattox & Blackwell (*Streptophyta*) to heavy metals // NBU Journal of Plant Sciences. 2009. Vol. 3. P. 39-41.
  14. **Сафиуллина Л.М.**, Гайсина Л.А., Бакиева Г.Р. Влияние тяжелых металлов на *Eustigmatos magnus* (В.Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) // Аграрная Россия. 2009. Специальный выпуск. С.58.
  15. **Сафиуллина Л.М.**, Фазлутдинова А.И., Бакиева Г.Р. Толерантность почвенных водорослей *Eustigmatos magnus* (J.B. Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) и *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow in Cleve et Grunow (*Bacillariophyta*) к воздействию тяжелых металлов // Вестник ОГУ №6 (100). 2009. С. 609.
  16. Бакиева Г.Р., Гайсина Л.А., **Сафиуллина Л.М.**, Пурина Е.С. Анализ особенностей пространственной организации альгоценозов лесных экосистем Южно-Уральского государственного природного заповедника (ЮУГЗ) // Вестник ОГУ. №6 (100). 2009, С.57.