

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ВОДНЫХ РЕСУРСОВ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное унитарное предприятие
РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
КОМПЛЕКСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И ОХРАНЫ ВОДНЫХ
РЕСУРСОВ
(ФГУП РосНИИВХ)

УДК 574.583: 582.264:582.232

№ гос.
регистрации
Инв.№

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГУП РосНИИВХ,
д.э.н., профессор



Н. Б. Прохорова
10 2012 г.

ОТЧЕТ

о научно-исследовательской работе

Изучение механизма взаимодействия хлореллы (*Chlorella vulgaris* ИФР №C-111) с сообществами синезеленых водорослей поверхностных водоемов в окрестностях Екатеринбурга

(Договор № 8-2011 от 20.09.2011)

Научный руководитель,
академик РЭА, д.т.н., профессор


А.Н. Попов

Ответственный исполнитель, к.б.н.


Т.Е. Павлюк

Екатеринбург 2012

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,
д-р техн. наук, проф



03.10.12

подпись, дата

А.Н.Попов (методическое
руководство и координация
выполнения темы, редакция
отчета)

Исполнитель, ведущий
инженер



подпись, дата

Е.А. Бутакова (выполнение
полевых работ, проведение
исследований, написание
разделов 1, 2, 3, 4, 5, 6)

Исполнитель, инженер II
категории



подпись, дата

О.С. Ушакова (выполнение
полевых работ, выполнение
исследований, написание
разделов 7, 8, 9)

Исполнитель, главный
специалист

подпись, дата

В.Ф Мухутдинов
(выполнение исследований,
выполнение полевых работ)

Исполнитель, зав. сектором
ГБИ



02.10.12

подпись, дата

Т.Е. Павлюк (координация
выполнения темы, редакция
отчета, выполнение полевых
работ)

Исполнитель, научный
сотрудник



подпись, дата

А.С. Фоминых (выполнение
полевых работ)

РЕФЕРАТ

Отчет 95 страниц, 9 частей, 29 рисунков, 3 таблицы, 48 источников, 2 приложения.

Ключевые слова: КУЛЬТУРА ШТАММА ХЛОРЕЛЛЫ *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111, СИНЕЗЕЛЕНЫЕ ВОДОРОСЛИ, «ЦВЕТЕНИЕ» ВОДОЕМОВ, МЕТАБОЛИТЫ ВОДОРОСЛЕЙ, МЕЖВИДОВАЯ КОНКУРЕНЦИЯ ПЛАНКТОННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ ПРЕСНЫХ ВОДОЕМОВ, БИОГЕННЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ, ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ, НЕФТЕПРОДУКТЫ

Цель работы: Проверить различные возможные гипотезы о механизме взаимодействия *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 с сообществами синезеленых водорослей.

Данная работа необходима для теоретического обоснования применения на практике метода альголизации для предотвращения «цветения» воды синезелеными водорослями. Работа выполняется на материале поверхностных водоемов в окрестностях Екатеринбурга с использованием культуры штамма *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111, полученной от ООО НПО «Альгобиотехнология».

На первом этапе работы были изучены теоретические основы возможности использования конкурентных взаимоотношений водорослей для предотвращения «цветения» водоемов синезелеными водорослями, далее проанализирована и протестирована культура штамма *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111, приведены сведения о синезеленых водорослях, вызывающих «цветение» водоемов в окрестностях г. Екатеринбурга, проверены различные гипотезы о взаимодействии хлореллы с сообществами синезеленых водорослей, изучено ее влияние на содержание биогенных элементов, тяжелых металлов и нефтепродуктов в водной среды.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ЛИТЕРАТУРНО-ПАТЕНТНЫЙ ОБЗОР	7
1.1 Экология микроводорослей (общие сведения)	7
1.2 Экологическая ниша фитопланктона	9
1.3 Метаболиты водорослей	12
1.4 Характеристика <i>Chlorella vulgaris</i>	16
1.5 Особенности штамма <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111	19
2. МЕТОДИКА	22
3. ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111	25
3.1 Определение характера веществ, содержащихся в хлорелле и выделяемых ею во внешнюю среду	25
3.2 Концентрация клеток в культуре	27
4. ХАРАКТЕРИСТИКА СИНЕЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ	
водоемов окрестностей г. Екатеринбурга	28
4.1 Видовой состав синезеленых водорослей, вызывающих «цветение» воды в водоемах в окрестностях Екатеринбурга в 2011 – 2012 годах	28
4.2 Определение характера веществ, содержащихся в синезеленых водорослях и выделяемых ими во внешнюю среду (на примере водорослей Белоярского водохранилища)	29
5. БИОТЕСТИРОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111	31
6. ЭКСПЕРИМЕНТ по изучению нескольких гипотез механизма действия <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111 на синезеленые водоросли	35
7. ЭКСПЕРИМЕНТ по изучению потребления биогенных элементов культурой хлореллы <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111 в сравнении с синезелеными водорослями	45
8. ЭКСПЕРИМЕНТ по изучению влияния <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111 на содержание тяжелых металлов в водной среде	56
9. ЭКСПЕРИМЕНТ по изучению влияния <i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С – 111 на содержание нефтепродуктов в водной среде	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	68
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	70
ПРИЛОЖЕНИЯ	74

ВВЕДЕНИЕ

«Цветение» пресных континентальных водоемов является одной из самых негативных и наиболее распространенных экологических проблем. «Цветением» воды считают массовое развитие одного или двух-трех планктонных видов водорослей, сопровождающееся значительным ухудшением качества воды, затрудняющее хозяйственное использование водоема и представляющее опасность для здоровья человека и животных [1]. В подавляющем большинстве случаев подобного массового развития достигают представители нескольких родов синезеленых водорослей [2], таких как *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Coelosphaerium*, *Woronichinia* и некоторых других. Проблема «цветения» наиболее остро возникает в искусственно созданных водоемах с источниками антропогенного поступления дополнительных органических и минеральных веществ [3].

Развитие водорослей во время «цветения» достигает внушительного уровня: их биомасса может составлять 1 – 2 г/л, в местах скоплений 5 – 7 г/л, а в пятнах «цветения» на поверхности воды может доходить до 50 – 70 г/л [4].

Снижение качества воды при возникновении массового развития синезеленых водорослей заставляет искать способы борьбы с «цветением». В настоящее время известно несколько методов борьбы с массовым развитием синезеленых водорослей: механическое изъятие массы водорослей, усиление проточности и водообмена, разбавление водой, обедненной биогенными элементами, искусственная аэрация воды, удаление эвтрофированных водных масс и иловых донных отложений (это наиболее эффективные методы, но они требуют больших материальных затрат). Кроме того, можно использовать различные реагенты, такие как коагулянты (при этом необходимо решить техническую проблему удаления образующихся хлопьев), депрессоры испарения воды с поверхности водоема, альгициды (однако, нет таких веществ, которые избирательно удаляли бы только синезеленые водоросли). Среди можно назвать использование ультразвука, однако, это дорогой метод, эффективный для небольших водоемов, а его безопасность для водных экосистем является предметом дискуссий [1]. Предлагается также внесение азотных и фосфорных удобрений для изменения величины отношения азота к фосфору для получения эффекта направленного регулирования типа «цветения» в сторону повышения биомассы зеленых водорослей [5].

Наиболее перспективными представляются биологические методы борьбы с «цветением» воды. Эти методы более безопасны для людей и не наносят вреда сообществам гидробионтов. Среди биологических методов борьбы с «цветением» в

настоящее время известны: использование вирусов синезеленых водорослей LPP – 1, LPP – 1A (этот метод в настоящее время не применяется, потому что данные вирусы могут быть опасны для людей), заселение водохранилищ растительноядными рыбами, такими как белый амур, белый и пестрый толстолобики, тиляпия (однако, показано, что при применении данного метода «цветение» может даже усиливаться), использование высшей водной растительности (показано, что макрофиты конкурируют с водорослями за биогенные вещества, выделяют кислород и затеняют ниже лежащие слои воды, их метаболиты проявляют фитонцидные свойства. Однако этот метод подходит для небольших водоемов, и при этом фитомассу макрофитов следует удалять, что является непростой задачей) [1].

Основная теоретическая идея обсуждаемого метода альголизации – изменить структуру фитопланктона сообщества, то есть сместить соотношение зеленых и синезеленых водорослей в сторону зеленых, развитие которых препятствует возникновению «цветения». С этой целью предлагается вводить в водоем штаммы *Chlorella vulgaris* BIN или ИФР №С-111, проявляющие себя более активно по сравнению с аборигенными видами планктона зеленых водорослей [5]. Иными словами, предполагается, что в основе метода альголизации лежат экологические механизмы взаимодействия сообществ (популяций) микроскопических планктонных водорослей.

Метод альголизации в настоящее время используется на практике в некоторых водоемах, однако до сих пор не изучен механизм воздействия изучаемого штамма хлореллы на звенья водной биоты, в связи с чем, возможно несколько альтернативных гипотез по данному вопросу.

Целью настоящего исследования является:

Проверить различные возможные гипотезы о механизме взаимодействия *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 с сообществами синезеленых водорослей.

Были сформулированы следующие гипотезы и спланированы соответствующие эксперименты для их проверки:

- 1) Штамм *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 в процессе своей жизнедеятельности подавляет развитие синезеленых водорослей (глава 5).
- 2) Штамм *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 выделяет в процессе жизнедеятельности экзометаболиты, подавляющие развитие синезеленых водорослей (главы 3, 4, 6).
- 3) Штамм *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 конкурирует с синезелеными водорослями путем более активного поглощения биогенных элементов из воды, лимитируя развитие синезеленых водорослей (глава 7).

1. ЛИТЕРАТУРНО-ПАТЕНТНЫЙ ОБЗОР

1.1 Экология микроводорослей (общие сведения)

Популяцией у микроводорослей, как у всех микроорганизмов, называют совокупность индивидов, занимающих определенный ареал, объединенных общностью происхождения и относительно равными условиями для деления каждой особи [6]. Динамика развития популяции микроорганизмов описывается графиком зависимости числа клеток от времени, кривая роста состоит из начальной (во время которой происходит адаптация клеток), логарифмической (характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток) и стационарной (число клеток перестает увеличиваться) фаз [7].

Основная особенность экологии микроорганизмов (микроскопических водорослей в том числе) заключается в том, что они взаимодействуют со средой и другими микроорганизмами преимущественно химическим путем [8], поглощая или выделяя различные вещества. Среду для микроорганизмов составляют: субстраты (вещества, поступающие в клетку, необходимые для построения клетки и обеспечения ее энергией), продукты метаболизма (вещества, выделяемые клетками), ингибиторы и стимуляторы химической и физической природы (вещества, не являющиеся субстратами, температура, свет, величина pH, осмотическое давление, окислительно-восстановительный потенциал и др.) [6]. Таким образом, в экологии микроорганизмов беспрецедентно для всего живого мира важную роль играют метаболиты, освобождаемые во внешнюю среду и составляющие часть этой среды как для выделивших их особей, так и для других членов сообществ [9].

Отношение микроорганизмов к тому или иному фактору также характеризуют графиком зависимости роста (например, числа клеток или скорости размножения) от интенсивности фактора. При этом определяют так называемые кардиальные точки: оптимальное значение (или область значений), обеспечивающее наилучший рост, а также минимальное и максимальное значения, при которых рост прекращается. Диапазон между минимальным и максимальным значениями составляет область толерантности. В области вне оптимума организм активен, но имеет более низкую конкурентоспособность и может быть вытеснен другими видами [8].

Микроводорослям, подобно всем остальным микроорганизмам, свойственны все известные виды экологических взаимодействий, как положительные, так и отрицательные, в частности, внутривидовая и межвидовая конкуренция [8]. При этом,

было показано, что в фитопланктоне между видами, существующими в природных экосистемах, положительное взаимодействие встречается в 10 раз чаще, а отрицательно – в 2 раза реже, чем между случайно выбранными видами. Дело в том, что взаимное ингибиование затрудняет, а самоингибиование облегчает существование видов [10]. Тем не менее, конкуренция между водорослями существует. Этот вид взаимодействия представляет собой активное отрицательное воздействие компонентов сообщества друг на друга в процессе борьбы за ограниченные ресурсы. Если ресурсы достаточны или водоросли находятся на таком расстоянии друг от друга, когда взаимное влияние невозможно, конкуренция отсутствует [11].

В случае внутривидовой конкуренции между особями сохраняется солидарность, они способны размножаться и обеспечивать, таким образом, передачу свойственных популяции наследственных признаков. Конкурентные взаимодействия между особями одного вида становятся более жесткими при увеличении плотности популяции. При высокой плотности популяции снижается скорость роста [11].

Конкурентное положение разных видов зависит от их способности вредить конкуренту или противодействовать его отрицательному влиянию. В конкурентных взаимоотношениях принято выделять виды победители и побежденные виды, если окончательная победа тех или иных видов в конкурентной борьбе не очевидна, говорят о высокой или о низкой конкурентоспособности видов [11]. Основной критерий конкурентоспособности у микроорганизмов – зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата по сравнению с конкурентами [6].

Для микроводорослей наиболее характерны два основных механизма конкуренции: более интенсивное поглощение и эффективное использование ограниченных ресурсов (свет, биогены) одним видом, что лишает конкурента возможности использовать данный ресурс, и аллелопатическое ингибиование роста и фотосинтеза сопутствующих видов водорослей метаболитами как при непосредственном контакте, так и через толщу воды [11]. Конкуренция за пространство, важная для макроводорослей, для микроводорослей, по всей вероятности, не столь важна.

Межвидовая конкуренция действует таким образом, что в определенных условиях может приводить к полному вытеснению одного из видов из данного местообитания в соответствии с широко известным принципом конкурентного исключения Г. Ф. Гаузе [8].

«Цветение» воды, то есть массовое развитие одного или двух-трех видов фитопланктона, с точки зрения общей экологии, является подтверждением принципа конкурентного исключения Гаузе в противовес «планктонному парадоксу». Парадокс этот состоит в том, что часто можно наблюдать, как многочисленные виды планктонных

организмов сосуществуют в простой среде, где мало возможностей для разделения ниш. Явление «планктонного парадокса» объясняют тем, что простая среда фитопланктона постоянно претерпевает различные изменения, например, суточные и сезонные. В любой отдельный промежуток времени условия среды могут способствовать вытеснению определенного вида, однако эти условия меняются, и еще до того, как данный вид окажется окончательно вытесненным, они могут сложиться благоприятно для его существования [12]. Кроме того, показано, что клеточные циклы и пищевые потребности, следовательно, и конкурентные преимущества планктонных автотрофов находятся в зависимости от фотопериода, а потому меняются в течение дня, что стабилизирует многовидовое сообщество. Оптимальной стратегией для успешности нового вида-вселенца является максимальная скорость роста в утренние часы, когда пищевые запросы существующих видов в совокупности минимальны [13].

1.2 Экологическая ниша фитопланктона

И синезеленые, и зеленые хлорококковые водоросли (к которым относится изучаемый вид *Chlorella vulgaris* [4]) занимают в водоемах экологическую нишу планктонных фотосинтезирующих организмов. Ресурсами для микроводорослей (за которые они конкурируют) являются свет и наличие минеральных солей.

Основным физическим фактором, определяющим развитие фитопланктона, является свет. При прохождении света сквозь толщу воды снижается его интенсивность и меняется спектральный состав. Наиболее резко (на глубине первых метров) отсекаются инфракрасные и красные лучи, глубже всех проникают лучи с длиной волны 540 — 560 нм [8]. Оптимальная интенсивность света для развития и фотосинтеза фитопланктона лежит в пределах 3000 — 10000 люкс при длине волны 450 и 680 ммк. Наиболее благоприятные условия для развития фитопланктона создаются в поверхностных слоях водоема, преимущественно на глубине 20 — 50 см, где интенсивность солнечного света и его спектральный состав приближаются к оптимуму развития водорослей (здесь находится экологическая ниша для большинства видов фитопланктона). Однако водоросли могут развиваться и в условиях более низкой освещенности. А есть виды, предпочитающие развиваться на глубине нескольких метров от поверхности, достигая 10 — 12 м. Это, в основном, синезеленые водоросли: некоторые виды рода *Lyngbya*, а также ряд видов из рода *Oscillatoria* [14].

Оптимальная для фотосинтеза глубина зависит от трофности водоема. На примере озер Латвии было показано, что в эвтрофных водоемах, где приток биогенных элементов

постоянен, и фитопланктон развивается интенсивно, мощность трофогенного слоя значительно снижается по сравнению с чистыми олиготрофными водоемами (1,2 и 15 м соответственно) [14]. Можно предположить, что в таком ограниченном слое, подходящем для развития фитопланктона, во время массового развития водорослей складываются условия, в которых возможна конкуренция не только за ресурсы, но и за пространство.

Температура воды также определяет уровень развития фитопланктона. Обе таксономические группы (зеленые и синезеленые водоросли) являются теплолюбивыми [4], поэтому начинают активно развиваться после того, как водоем достаточно прогреется.

Для развития водорослей необходимы макро- и микроэлементы. Особая роль среди макроэлементов принадлежит азоту и фосфору. Азот входит в состав всех белковых молекул, фосфор – обязательный компонент ядерного вещества, участвует в энергетическом обмене клеток и окислительно-восстановительных реакциях. Несмотря на то, что в пресноводных экосистемах именно нитраты и фосфаты часто относятся к лимитирующему факторам [4], в эвтрофные водоемы эти соединения поступают в избыточном количестве [1]. Содержание соединений биогенных элементов в среде значительно меняется в течение суток: концентрация фосфатов и солей аммония повышается в темноте и снижается на свету [15].

Круговорот азота в эвтрофных водоемах происходит следующим образом: повышенное поступление биогенных элементов способствует высокому уровню фотосинтеза и образованию большого количества органических веществ, за счет чего водоем обогащается органическим азотом. Биогенный распад органического вещества фитопланктона в толще воды и в иловых отложениях происходит с поглощением кислорода, минерализацией органического азота до углекислого аммония и дальнейшим окислением его до нитратов. Водная масса бывает насыщена кислородом в количестве, достаточном для окисления аммония до нитратов, только весной и осенью в период полной циркуляции воды. В период стратификации гиполимнион теряет кислород, аммонийные соли, поступающие из илового раствора, окисляются в придонных слоях до нитратов только в первые дни после установления летней стратификации, пока не израсходован весь кислород. По мере исчезновения кислорода в гиполимнионе нитраты в бескислородной зоне постепенно исчезают, и весь гиполимнион обогащается аммонийными солями [14]. В то же самое время, на свету в непосредственной близости от скопления водорослей нередко создаются условия со 100%-м насыщением воды кислородом. Например, пятна цветения цианобактерий (синезеленых водорослей) при освещении часто бывают покрыты пузырьками выделяющегося кислорода [8], что способствует переходу аммонийного азота в нитратный.

Потребность в наличии минерального азота в водной среде у зеленых и синезеленых водорослей неодинакова. Не обладающие способностью к фиксации атмосферного азота зеленые водоросли сильнее зависят от концентрации соединений азота, чем синезеленые, среди которых немало азотфиксаторов. Оптимальные дозы нитратного азота для зеленых водорослей выражаются целыми миллиграммами на литр. Особенно требовательны к азоту зеленые протококковые (хлорококковые) водоросли, к которым принадлежит *Chlorella vulgaris*. У этой группы водорослей максимальное развитие происходит при наличии его в среде 5 мг/л и выше. У синезеленых водорослей максимальный прирост наблюдается при концентрации нитратного азота от 0,6 до 2 мг/л, а аммонийного азота для такого же эффекта достаточно внести в 10 раз меньше [16].

Синезеленые и зеленые водоросли неодинаково относятся к разным минеральным формам азота. Аммонийный азот более благоприятен для синезеленых, чем нитратный, выступая для них и как субстрат, и как активный регулятор ферментативных процессов. Для зеленых водорослей, обладающих более активной и совершенной нитратредуктазой, более подходит нитратный азот [15]. Следовательно, в водной среде, обогнанной кислородом и богатой аммонийными солями, складываются благоприятные условия для «цветения» воды синезелеными водорослями, тогда как в воде, насыщенной нитратами, будут лучше развиваться зеленые водоросли.

Потребность в фосфоре у различных групп водорослей примерно одинакова. Наилучшее развитие зеленых и синезеленых водорослей происходит, когда среда содержит от 0,2 до 0,8 мг/л фосфатов [16]. Считается, что «цветение» воды начинается, если в толще воды содержится более 0,5 мг/л фосфора. Концентрация фосфора ниже 0,02 мг/л сдерживает развитие водорослей. Водоросли способны усваивать фосфаты, гидрофосфаты и дигидрофосфаты, а также простые органические соединения фосфора [1]. При симбиозе с бактериями водоросли способны усваивать органический фосфор [15].

Обе изучаемые группы водорослей не зависят от содержания в окружающей среде органических соединений. Для построения всех веществ клетки им нужен минимум простых неорганических соединений: углекислота, самые простые формы азота (аммонийные, нитратные соли), минеральные соли (источники фосфора, серы, магния, железа, микроэлементов), вода, т. е., зеленые и синезеленые водоросли являются прямыми конкурентами за биогенные элементы.

Конкурентное преимущество в борьбе за ресурсы одна или другая изучаемая группа может получить за счет различий в своих потребностях, которые определяются физиологическими особенностями. Зеленые водоросли (хлорелла в том числе) по своей физиологии близки к высшим растениям – содержат те же пигменты (хлорофиллы а и б,

каротины, ксантофиллы) и тот же состав ферментов, участвующих в фотосинтезе, запасают крахмал [17], осуществляют фотосинтез кислородного типа на свету, а также дыхание для поддержания жизнедеятельности в темноте [18]. Метаболизм синезеленых водорослей более пластичен: при недостатке в среде соединений азота их многие виды способны фиксировать атмосферный азот. Протекание азотфиксации зависит от содержания в среде соединений азота и молекулярного кислорода (оба фактора действуют на фермент азотфиксации – нитрогеназу): с повышением концентрации этих компонентов способность к фиксации азота снижается вплоть до затухания. Кроме фотосинтеза кислородного типа и дыхания синезеленые водоросли при определенных условиях способны переходить на фотосинтез бескислородного типа, анаэробное дыхание, а также (очень редко и немногие виды) на брожение [20].

Таким образом, экологические ниши хлореллы и синезеленых водорослей очень близки, но не тождественны в силу различий их физиологических особенностей. Можно предположить, что при низкой плотности клеток эти водоросли не конкурируют. Конкуренция возникает, когда плотность фитопланктона повышается, например, во время «цветения».

1.3 Метаболиты водорослей

Роль метаболитов во взаимодействии водорослей (аллелопатическая конкуренция) была обнаружена достаточно давно, прежде всего, на основании опытов с культурами водорослей. В лабораторных условиях установлено, что культуральная жидкость старых культур подавляет развитие новой культуры этого же вида (это было показано как на синезеленых, так и на зеленых водорослях). При разбавлении этой жидкости ростингибирующее действие снижается.

В дикультурах (то есть при совместном выращивании культур двух видов водорослей) взаимовлияние видов не одинаково у различных пар. В одних случаях оно более, в других менее антагонистично, но в большинстве случаев оказывает отрицательное влияние на рост обеих культур. Было показано, что концентрация биологически активных веществ в дикультуре больше, чем в монокультуре.

Предварительное выращивание одного из видов в течение нескольких дней до внесения второго вида усиливает ингибицию роста второго вида вне зависимости от последовательности внесения. Угнетение внесенных видов было тем больше, чем больше была плотность доминирующего вида. Внесенный вид был угнетен вплоть до полного отмирания. При выращивании второго вида на культуральной жидкости из-под первого

также наблюдалось ингибирование его роста, которое снижалось после фильтрации культуральной жидкости через активированный уголь [21].

Дальнейшее изучение метаболитов показало, что в разные фазы развития популяции водоросли выделяют разные вещества. Первичные метаболиты выделяются в начальной и логарифмической фазе роста популяции (фазе максимальной скорости прироста численности клеток), представляют собой полупродукты и продукты катаболизма субстратов: этанол, кислоты (молочная, уксусная, пировиноградная, цикла трикарбоновых кислот), а также полупродукты биосинтеза – аминокислоты, витамины. Вторичные метаболиты выделяются во время стационарной фазы роста популяции (во время которой количество клеток остается постоянным), они представляют собой продукты биосинтеза (антибиотики, токсины, пигменты) [6].

Динамику выделения и потребления первичных метаболитов можно проследить на примере органических кислот, которые являются постоянным компонентом внеклеточных растворимых соединений культуральных сред всех групп водорослей. Общее содержание органических кислот в первые 2 – 5 дней роста культуры (начальная фаза роста) составляет 75 – 95 % всех внеклеточных органических веществ. В логарифмической фазе роста культур, когда большинство клеток водорослей бурно растет и размножается, в период наиболее интенсивно протекающих фотосинтетических процессов содержание органических кислот в фильтрате значительно снижается (до 15 – 20 %). В конце логарифмической и в стационарной фазе роста процентное содержание внеклеточных летучих органических кислот снова увеличивается, что связано с увеличением плотности культур и с ослаблением интенсивности основных физиологических процессов, в результате чего поглощение органических кислот снижается [22]. Это означает, что в начальной фазе роста культура выделяет вещества, необходимые ей в дальнейшем для активного роста и развития.

Метаболиты микроводорослей могут ингибировать и стимулировать рост популяции [6]. Среди веществ, оказывающих угнетающее действие на разные группы водорослей, отмечаются эфирные масла, карбоновые и жирные кислоты, спирты, насыщенные и ненасыщенные углеводороды и другие органические соединения [21]. Ингибирующие вещества регулируют численность своего вида и видов-конкурентов. Накопление ингибиторов определяет уровень развития, роста и размножения водорослей в водоеме, смену доминирующих видов, распределение водорослей. Внезапное исчезновение единственного доминирующего вида при «цветении» связано с его неспособностью противостоять подавляющему действию собственных ингибиторов. С экзогенными метаболитами связано также явление не совпадения максимального развития

фитопланктона с периодами наибольшего содержания биогенных элементов в водоеме [23]. Возможно, действие метаболитов зависит от их концентрации: низкие концентрации стимулируют рост водорослей, особенно того вида, который их выделил, высокие концентрации ингибируют рост, сначала других видов, а впоследствии, с повышением концентрации, и своего вида.

Наиболее активные выделения обнаружены у жизнеспособных активно делящихся и развивающихся водорослей. По мере старения популяции ингибирующее действие метаболитов снижается [15]. Установлено, что загнивающая масса синезеленых водорослей не оказывает ингибирующее и автоингибирующее действие, поэтому даже в ней могут формироваться молодые жизнеспособные колонии этого же вида, а после отмирания синезеленых в водоеме активизируется жизнедеятельность зеленых водорослей [15, 21]. Ингибирующие компоненты сохраняются в сухой массе водорослей, но через год оказывают не ингибирующее, а стимулирующее действие [15].

Некоторые продукты метаболизма выполняют специальную регуляторную функцию и выделяются клетками в небольшом количестве непосредственно для изменения скорости роста популяции в соответствии с условиями окружающей среды (прежде всего, в зависимости от плотности клеток), а также для осуществления взаимоотношений с другими аналогичными популяциями [6], такие как хлореллин (предположительно, продукт распада каротина) [21, 24].

Существуют токсичные метаболиты, оказывающие негативное действие на водоросли, разные группы гидробионтов, а также на человека и животных, использующих воду для питья. Например, под воздействием подобных метаболитов наблюдается гибель и изменение цикла развития планктонных беспозвоночных, а также гибель и заболевания рыбы. У диких и домашних животных и птиц токсины водорослей вызывают заболевания и гибель, у людей – аллергические реакции и расстройства пищеварения. В частности, есть предположения, что сезонные эпидемические гастроэнтериты неизвестной этиологии могут быть связаны с интоксикацией питьевых водоемов водорослями. У птиц существует адаптация к «цветению» воды: в тех водоемах, где наблюдается «цветение», птицы откладывают яйца только зимой (на примере водоемов Европы) [25].

Но все-таки, изначально токсины водорослей выступают как регулятор водных биоценозов и средство борьбы за ареал, формируют видовой состав и численность фитопланктона [10]. Наиболее известны токсины синезеленых водорослей, например, афанотоксин (токсин *Aphanizomenon flos-aqua*, алкалоид), осциллатория-токсин (природа неизвестна) [10], микроцистин (токсин *Microcystis*, природа до конца неизвестна, обладает особенно высокой ингибирующей активностью) [15]. Некоторые токсины встречаются не

у одной, а у разных групп водорослей, такие, как сакситоксин (3,4,6-триалкилтетрагидропурин), который обнаружен и у синезеленых, но чаще встречается у динофитовых водорослей [10].

Водоросли могут вырабатывать все те же фитогормоны, что и высшие растения, и механизм действия фитогормонов универсален. Установлено, что водоросли способны синтезировать ауксин (фитогормон, стимулирующий рост) и гибберелин (фитогормон, ингибирующий рост) в концентрации на несколько порядков выше, чем цветковые растения, причем избыток гормонов не оказывает на их рост токсического действия [10].

В экспериментах было установлено, что синезеленые водоросли (*Microcystis aeruginosa*, *M. pulvrea*, *Phormidium uncinatum* и *Anacystis nidulans*) положительно реагируют на экзогенные добавки индолилуксусной кислоты (ИУК) (одна из форм ауксина) в среду до концентрации 2 – 10 мг/л: увеличивается биомасса (сухое вещество) водорослей, количество клеток и содержание пигментов, повышается интенсивность выделения кислорода. Добавка ИУК к воде задерживает отмирание колоний природных популяций *Microcystis aeruginosa*. Чувствительность синезеленых водорослей к экзогенной добавке ИУК дает основание предположить, что одной из причин массового развития синезеленых водорослей является накопление в водоеме физиологически активных веществ, продуцируемых в основном другими организмами [26].

Таким образом, водоросли выделяют в окружающую среду специфические ингибиторы роста, представляющие собой легко подвижные многокомпонентные системы биологически активных веществ [15]. Это свойственно прежде всего синезеленым, но справедливо и для других групп водорослей. Колебания численности фитопланктона, сукцессия видов во времени определяется аллелопатическими взаимодействиями [10].

Несмотря на то, что основные закономерности продуцирования метаболитов водорослями исследованы на культурах в лабораторных условиях, можно утверждать, что они справедливы и для естественных экосистем. Водоросли в природных водоемах действительно выделяют органическое вещество в значительном количестве: внеклеточная продукция растворенного органического вещества фитопланктона по некоторым данным составляет в разных условиях от 10 – 30 до 95% от общей первичной продукции. В среднем в морских и пресных водоемах от 10 до 40 % общей первичной продукции планктонных водорослей выделяется во внешнюю среду и может служить источником углерода и энергии для водных организмов. Беспозвоночные животные не могут потреблять такое вещество, водоросли потребляют его значительно медленнее, чем бактерии [27]. Можно предположить, что такое большое количество органического вещества выделяется водорослями для формирования среды своего существования.

Аллелопатические механизмы действуют во время «цветения» воды: в период массового развития синезеленых водорослей зеленые исчезают из сообщества или переходят в резистентную форму. Формируется специфический биоценоз, в котором попеременно доминирует один из видов синезеленых водорослей, характерных для водоема, составляя 95 – 98 % общей численности и биомассы фитопланктона. Этот вид находится в состоянии активной жизнедеятельности, остальные водоросли встречаются в незначительном количестве и находятся в подавленном состоянии (у них может быть нарушено деление, угнетена ассимиляция, изменена морфология). Доминирование этого вида может смениться доминированием другого вида синезеленых водорослей. После отмирания синезеленых начинают развиваться водоросли из других систематических групп [15].

Таким образом, для планктонных микроводорослей характерны все известные виды экологического взаимодействия, в том числе межвидовая конкуренция. Основными механизмами межвидовой конкуренции у водорослей являются конкуренция за ресурсы (свет и биогены) и конкуренция с использованием экзометаболитов (аллелопатическая конкуренция). Распространенное негативное явление – «цветение» водоемов синезелеными водорослями – связано с тем, что эта группа получает конкурентное преимущество за счет своего уникального пластичного метаболизма и выделяемых токсичных метаболитов, и по сути, является подтверждением принципа конкурентного исключения Гаузе. Вместе с тем, за пределами периода «цветения» водоема, а также в водоемах, не подверженных «цветению», для фитопланктона более характерен «планктонный парадокс», при котором виды, имеющие сходные экологические ниши сосуществуют, не вытесняя друг друга. Этот парадокс связан с тем, что условия существования фитопланктона постоянно меняются, и виды чутко реагируют на эти изменения. Можно предположить, что при наличии в водоеме видов водорослей, сравнимых с синезелеными своей активностью, система фитопланктона находилась бы в состоянии «парадокса», не переходя к «цветению». Метод альголизации подразумевает, что в качестве такого активного компонента фитопланктона можно использовать культуру хлореллы.

1.4 Характеристика *Chlorella vulgaris*

Вид *Chlorella vulgaris* относится к роду *Chlorella* из группы зеленых хлорокковых водорослей (более раннее название – протокковые), в основном представленных одиночными клетками. Описание рода *Chlorella* было сделано Бейеринком в 1890 году. Современную классификацию рода *Chlorella* провела В. М. Андреева. Представители рода

широко распространены в природе, встречаются в различных водоемах, а также во вневодных местах обитания (на коре деревьев, в почве). Имеет большое хозяйственное значение, так как отдельные виды (*Chlorella vulgaris*, прежде всего) культивируют и используют в качестве стимулирующих пищевых и кормовых добавок, а также применяют в медицинской, парфюмерной и других отраслях промышленности. Лабораторные культуры *Chlorella vulgaris* используют в качестве удобного модельного объекта для выяснения механизмов дыхания и фотосинтеза, продуктивности фотосинтетического аппарата, вопросов биологического саморегулирования и биосинтеза различных соединений, а также для решения фундаментальных проблем физиологии, биохимии, генетики [4, 28, 29].

Интенсивное изучение и культивирование культуры хлореллы и других хлорококковых водорослей проводилось в СССР в 1960 – 80-е годы, после чего интерес к ней в нашей стране снизился. В 1970-е годы на территории СССР функционировало более 600 установок-реакторов по производству суспензии хлореллы. Больше всего таких установок было в южных регионах, например, в Узбекистане, то есть там, где тепло и не требовалось дополнительного оборудования для создания оптимальных температурных условий для культур. Полученная суспензия использовалась в животноводстве, птицеводстве, растениеводстве, шелководстве столь широко, что предлагалось выделение целой новой отрасли сельского хозяйства – водорослеводства. Термин «кальголизация» появился тогда же, и обозначал первоначально внесение суспензии хлореллы в почву для повышения ее плодородия. Единственным ограничением для применения хлореллы в пищевой промышленности является ее прочная целлюлозная оболочка, трудно перевариваемая желудком человека. Для устранения этого недостатка необходимо применять различные методы для разрушения оболочки [30, 31]. В отличие от Российской Федерации и стран бывшего СССР, где интерес к культивированию водорослей и производства из них биологически активных добавок снизился, мировой объем продаж продуктов из микроводорослей неуклонно растет: так, в 2008 году он оценивался примерно в 7 миллиардов долларов США [32].

Суспензия *Chlorella vulgaris* использовалась для очистки сточных вод. Так, например, ее штамм K9 применялся для очистки сточных вод крупной свинофермы. Установлено, что в результате культивирования водорослей количество азота снижалось в среднем на 94,8 %, фосфора – на 98,5 %, магния – на 76%. Обнаружен интересный факт: фосфор, азот и магний удалялись из среды в большей степени, чем за счет одного лишь фиксирования в биомассе водорослей. Эту разницу вызывали физические факторы:

сорбция ионов на клетках водорослей, коагуляция биологических коллоидов под влиянием экстраклеточных полимеров и т.п. [33].

Состав массы хлореллы в эпоху ее изучения был досконально изучен. Оказалось, что она является источником аминокислот, белков, витаминов, а также биологически активных веществ [30, 31, 32]. Состав клеточной массы зависит от состава среды: хлорелла, растущая на среде, богатой азотом, накапливает преимущественно белок, при дефиците азота она синтезирует главным образом жиры и углеводы, добавление к среде глюкозы и ацетата приводит к повышению содержания каротиноидов и т.д. [34].

Экзометаболиты хлореллы также достаточно хорошо были изучены в конце прошлого века. Экскреция (выделение) метаболитов особенно интенсивно происходит на начальных этапах роста культуры, а затем несколько замедляется. Установлено, что около десятой части по массе всех синтезированных хлореллой веществ переходит в среду. В культуральной жидкости всего было обнаружено 310 веществ, а в самой хлорелле – 350. В составе метаболитов выделяют нативные экзометаболиты (вещества, специально выделяемые клетками хлореллы), продукты распада, лизиса и повреждения клеток, а также остатки материнских клеток после выхода из них автоспор при размножении. Биомасса и культуральная среда хлореллы содержит следующие группы соединений [34]:

- Углеводы – среди них стоит упомянуть хлон А, полисахарид, который индуцирует образование интерферона у млекопитающих [10];
- Углеводороды;
- Жирные и органические кислоты. Некоторые органические кислоты, например, уксусная и пировиноградная, стимулируют и поддерживают рост водорослей, в данном случае, хлореллы, в темноте [21];
- Амины, которые могут оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие на другие виды водорослей;
- Фенольные соединения;
- Витамины;
- Фитогормоны (в частности, ауксины).

Культура хлореллы обладает антимикробной активностью за счет выделения гексадекатреновой и октадекатетраеновой кислот [10], а также хлореллина [24]. Среди биологически активных веществ хлореллы также обнаружены стерины, кортикостероиды, половые гормоны, желчные спирты и кислоты, сердечные генины, сапогенины, стероидные алкалоиды, витамины группы D и другие [34].

Изучаемый штамм Chlorella vulgaris ИФР № С – 111 был выделен в 1977 году из воды Нурекского водохранилища (Таджикистан), изучен на протяжении 1977 – 1987 годов, после чего зарегистрирован в коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева, где получил свое название, и принят там же на депонирование [29]. Н. И. Богданов, выделивший штамм Chlorella vulgaris ИФР № С – 111, является автором патентов на данный штамм и способ его культивирования [35, 36], а также на альголизацию как способ борьбы с «цветением» водоемов синезелеными водорослями [37].

Морфологические свойства штамма: молодые клетки слабо эллипсоидные, размером 1,5 – 2 мкм. Взрослые – шаровидные, диаметром 6 – 9 мкм. Физиологические свойства: клетки образуют 2 – 8, редко 16 автоспор. Штамм автотрофный, в производственных условиях растет на среде, содержащей минеральные, органические и растворенные газообразные вещества. В лабораторных условиях растет на среде Тамийя. Штамм планктонный, обладает способностью к парению и равномерному распределению в культуральной среде, живые клетки практически не осаждаются, в результате чего не требуется механическое перемешивание суспензии. Цикл развития следующий: в светлый период суток идет активный процесс фотосинтеза, клетки растут и набирают биомассу: с 6 до 21 часа размеры клеток увеличиваются от 1,5 до 9 мкм. Активное деление наблюдается с 22 до 4 часов. С 5 часов молодые клетки готовы к фотосинтезу. При достижении плотности культуры 3 млн. клеток / мл проявляют антагонистические свойства к остальной микрофлоре, а также бактериям и инфузориям, поэтому при увеличении плотности развивается в монокультуре [29].

Суспензия хлореллы Chlorella vulgaris ИФР № С – 111 производится ООО НПО «Альгобиотехнология» для использования в различных отраслях животноводства для введения в комбикорма с целью повышения показателей продуктивности (мясной продукции, удоев молока повышенной жирности, яйценоскости, веса цыплят-бройлеров, рыбопродуктивности, массы коконов тутового шелкопряда, продуктивности пчелосемей), а также снижения заболеваемости и смертности животных [29].

Второе направление использования штамма Chlorella vulgaris ИФР № С – 111 ООО НПО «Альгобиотехнология» – это альголизация, введение суспензии в водоем для предотвращения его «цветения» синезелеными водорослями, иными словами, биологическая реабилитация водоемов. К настоящему времени альголизация применялась на Ижевском водохранилище в 2009 году (где были получены противоречивые

результаты), Матырском водохранилище (Грязинский район Липецкой области) в 2009 году [38], а также Белоярском, Леневском, Верхне-Выйском, Черноисточинском водохранилищах и Нижнетагильском городском пруду. Самая богатая история применения метода альголизации связана с Пензенским водохранилищем, где он применяется с 2001 года. Наблюдения показывают, что с начала альголизации «цветение» Пензенского водохранилища не повторяется [5].

Таким образом, существуют теоретические предпосылки, подтверждающие возможность применения метода альголизации на практике, однако на сегодняшний момент до сих пор не до конца изучен механизм воздействия хлореллы на синезеленые водоросли, так как возможно несколько альтернативных гипотез по данному вопросу. Существуют также и данные, свидетельствующие против использования этого метода. Самым резонным аргументом «против», на наш взгляд, является тот факт, что явление конкурентного вытеснения зелеными водорослями синезеленых в природе не встречается.

Обобщая все вышесказанное, учитывая, что целью настоящего исследования является проверка различных возможных гипотез о механизме взаимодействия *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 с сообществами синезеленых водорослей, в данном исследовании необходимо решить ряд задач:

1. Определить характер веществ, содержащихся в хлорелле и выделяемых ею во внешнюю среду.
2. Подсчитать концентрацию клеток хлореллы в полученной культуре.
3. Выявить состав синезеленых водорослей, вызывающих «цветение» воды в водоемах в окрестностях Екатеринбурга в 2011 – 2012 годах (2 – 5 проб).
4. Отобрать воду, содержащую вегетативные и покоящиеся формы синезеленых водорослей для проведения лабораторных экспериментов, выделения культур и получения спор синезеленых водорослей.
5. Провести биотест культуры хлореллы на прорастающих семенах.
6. Провести лабораторный эксперимент с водой из водоемов из окрестностей Екатеринбурга, содержащей синезеленые водоросли, и культурой хлореллы в разных концентрациях для одновременной проверки нескольких гипотез механизма действия хлореллы (5 вариантов в трех повторностях) с контролем численности синезеленых водорослей (186 проб).
7. Провести наблюдение за скоростью выедания биогенных элементов культурой хлореллы в сравнении с синезелеными водорослями в аквариуме с определением концентраций соединений азота и фосфора (NO_2 , NO_3 , NH_4 , N орг., P орг., PO_4).

8. Провести эксперимент с медью и цинком на предмет влияния культуры хлореллы на концентрацию тяжелых металлов в воде.

9. Провести эксперимент с нефтепродуктами, на предмет изменения их концентрации в результате жизнедеятельности культуры хлореллы.

10. Выполнить реферативно-патентный обзор литературных источников по указанной проблеме.

11. Выделить культуры синезеленых водорослей, получить материал, содержащий покоящиеся формы синезеленых водорослей.

12. Провести биотесты культуры хлореллы на культурах синезеленых водорослей и на прорастании покоящихся форм синезеленых водорослей.

Проанализировать полученные материалы и выделить ведущие (достоверные) механизмы во взаимодействии хлореллы и синезеленых водорослей

2. МЕТОДИКА

1) Культуральная жидкость и гомогенизированная клеточная масса культуры *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 была проанализирована на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N в двух вариантах с экстракцией хлористым метиленом и без экстракции на капиллярных колонках EC-1 ($15\text{м}^{\ast}0,25\text{мм}^{\ast}0,25\text{мкм}$) и ZB-WAX ($30\text{м}^{\ast}0,25\text{мм}^{\ast}0,25\text{мкм}$). Аналогично были проанализированы вода, в которой находились синезеленые водоросли, и их гомогенизированная масса. Протокол анализа приведен в Приложении А.

2) Численность и биомасса водорослей определялась счетно-объемным методом, в основе которого лежит счет, измерение клеток водорослей и определение их объема. Вес планктонных водорослей в данном методе приравнивается к единице (весу воды), поэтому суммарный объем водорослей составляет их массу. При этом учитывается соотношение: 10^9 мкм^3 равно 1 мг биомассы водорослей.

Пробы исходной воды для определения фитопланктона объемом 1 л концентрировались и фиксировались 40 % формалином. Численность клеток учитывалась в камере Горяева объемом $0,9 \text{ мм}^3$.

С учетом объемов исходной и концентрированной пробы, а также объема счетной камеры рассчитывался коэффициент, при помощи которого численность водорослей в камере пересчитывалась на численность в литре.

При подсчете каждый вид водорослей учитывался отдельно. Для каждого вида высчитывались средние размеры, по которым определялся средний объем, для чего форма клеток приравнивалась к близкому геометрическому телу. Средний объем клетки данного вида умножался на его численность, в результате чего получалась его биомасса. Сумма биомассы всех видов водорослей в пробе давала общую биомассу фитопланктона [4, 39].

- В эксперименте по изучению влияния культуры хлореллы на синезеленые водоросли отбирались пробы воды объемом 2 мл, не концентрировались, фиксировались 40 % формалином, клетки подсчитывались в камере Нажотта объемом 0,01 мл.

- В экспериментах по определению влияния культуры хлореллы на изменения концентрации тяжелых металлов и нефтепродуктов в воде в результате ее жизнедеятельности вначале исходная плотность культуры определялась как численность клеток прямым счетным методом в камере Горяева. Затем была проведена калибровка и определена зависимость между численностью клеток во взвеси оптической плотностью взвеси при длине волны (λ) 690 нм и в дальнейшем изменение плотности определялось

методом измерения оптической плотности. Измерения проводились на приборе спектрофотометр ЮНИКО 1201.

3) Физиологическая активность культуральной жидкости хлореллы была протестирована на прорастающих семенах редиса сорта «красный с белым кончиком» [40]. Для этого в 6 чашек Петри с фильтровальной бумагой на дне было залито: в 3 по 5 мл культуральной жидкости, в 3 по 5 мл дистиллированной воды (для контроля). Затем во все чашки были высеваны по 200 заблаговременно отсчитанных семян. Посев производился в 16 часов, учет результатов – в 9 утра следующего дня. Проросшие семена были посчитаны во всех чашках, затем вычислены средние значения для контроля и опыта. Данные о средней всхожести опытного варианта были выражены в процентах от контроля.

4) Влияние культуры хлореллы на развитие синезеленых водорослей было протестировано на 11 культурах цианобактерий, полученных в конце января 2012 года из коллекции CALU (коллекция Музея живых культур микроорганизмов СПбГУ, г. Санкт-Петербург). Список полученных культур (номер обозначает идентификатор данной культуры, под которым она значится в коллекции Музея):

- № 303. *Oscillatoria subbrevis* Schmidle, str. Lefevre.
- № 535. *Synechococcus* sp., str. Gromov 1969;
- № 657. *Oscillatoria* ef. *splendida* Grev., str. Komárek 1964;
- № 660. *Oscillatoria formosa* Bory., str. Komárek 1963;
- № 729. *Oscillatoria* sp., str. Gromov 1973;
- № 799. *Anabaena spiroides* Kleb., str. Avilov 1980;
- № 902. *Oscillatoria* sp., str. Gromov 1988;
- № 972. *Microcystis aeruginosa* Kuetz., str. Gromov 1990;
- № 1414 *Oscillatoria* sp., str. H.H. Титова;
- № 1415 *Oscillatoria* sp., str. H.H. Титова;
- № 1416 *Oscillatoria* sp., str. H.H. Титова.

Культуры представляют разные жизненные формы синезеленых водорослей: одноклеточные колониальные (*Synechococcus* sp., *Microcystis aeruginosa*), нитчатые без гетероцист (различные виды *Oscillatoria*) и нитчатые с гетероцистами (*Anabaena spiroides*). Отличительной физиологической чертой нитчатых синезеленых водорослей с гетероцистами является способность фиксировать газообразный азот круглосуточно, а не только в темное время.

Каждая из 11 культур синезеленых водорослей была посажена на 2 пробирки со средой № 6, приготовленной по прописи Музея культур микроорганизмов, в одну из которых был добавлен 1 мл культуры хлореллы.

Состав среды № 6 (в граммах на литр):

KNO ₃	1,0
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,15
NaHCO ₃	0,2
раствор микроэлементов	1,0 мл

Проведенный тест был качественным, так как не представляется возможным количественный посев синезеленых водорослей, особенно представителей рода *Oscillatoria*, образующих в культуре плотные кожистые дерновинки, прочно прикрепляющиеся к стенкам сосуда. В результате эксперимента получено описание изменений в росте и развитии синезеленых водорослей, таблица с которыми приведена в Приложении В.

С культурами № 535 (*Synechococcus sp.*) и № 972 (*Microcystis aeruginosa*), а также с материалом, содержащим акинеты синезеленых водорослей из Волчихинского и Верхне-Макаровского водохранилищ, был поставлен полукачественный уточняющий тест. Для этого к 9 мл среды № 6 и 1 мл культуры хлореллы (опыт) и к 10 мл среды № 6 (контроль) были добавлены по 1 мл культуры синезеленых водорослей (для культур № 535 и № 972) или по 0,1 г сухого порошка материала, содержащего акинеты синезеленых водорослей.

5) Для эксперимента по проверке гипотез о взаимодействии культуры штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 с сообществами синезеленых водорослей была отобрана вода с массой водорослей разной концентрации из пятен сгона в сентябре – октябре 2011 года на Верхне-Макаровском (27 сентября) и Белоярском водохранилищах (4 октября). Вода с синезелеными водорослями с добавлением заданного количества суспензии хлореллы (общий объем жидкости 300 мл) была разлита по коническим колбам объемом 500 мл, закрытым ватно-марлевыми пробками. Экспериментальные сосуды экспонировались при естественном освещении на протяжении месяца (с 7 октября по 7 ноября 2011 года). Для получения культуральной жидкости хлореллы без клеток суспензия была профильтрована через мембранные фильтры Владипор с размером пор 0,8 – 0,9 мкм. Полученная клеточная масса была перетерта в фарфоровой ступке со стеклянным порошком и использована в одном из вариантов проведения эксперимента.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ

Chlorella vulgaris ИФР № С – 111

3.1 Определение характера веществ, содержащихся в хлорелле и выделяемых ~~сюда~~ во внешнюю среду

Методом хромато-масс-спектроскопии (Приложение А) было установлено наличие в клеточной массе хлореллы следующих веществ (приводятся соединения, вероятность идентификации которых выше 50%, метод не позволяет установить количественное содержание):

- Спирты – 2-этилгексанол-1, октанол-1, 9,12,15-октадекатриен-1-ол, октадеканол-1, 2-фуранметанол;
- Кислоты –пропановая, пентановая, уксусная, гексадекановая;
- Альдегиды – бензальдегид, 5-метил-2-фуранкарбоксальдегид;
- Алканы – нонадекан;
- фурфурол, индол, фенол, ацетамид, 2-гидроксициклогептадеканон.

Среди этих веществ установленной биологической активностью обладает индол, который является фрагментом растительного гормона роста ауксина, входит в состав алкалоидов. Спирты, кислоты, альдегиды и алканы, содержащиеся в клетке, могут быть выделены во внешнюю среду.

В культуральной жидкости хлореллы обнаружены следующие вещества:

- Кислоты – пропановая, бутановая, пентановая, гексановая, гептановая, уксусная, тетрадекановая, гексадекановая, 2-пропеновая кислота;
- Алканы и алкены – тетрадекан, гексадекан, гептадекан, октадекан, додекан, декен-1;
- Спирты – гексадеканол-1, 2-этилгексанол-1, гексадеканол-1, гептадеканол-1, октанол-1, додеканол-1;
- Альдегиды – 2-гидроксибензальдегид;
- Эйказан, бензтиазол, ди(2-этилгексил)фталат и диэтилфталат, фенол и 2-метилфенол, циклодекан, ацетамид.

Установленной биологической активностью обладают бензтиазол, обладающий гербицидным действием, и пропановая кислота, препятствующая росту бактерий. В культуральной жидкости обнаружен более обширный состав кислот, чем в клеточной массе. Кислоты играют важную роль в обмене веществ клеток водорослей, поддерживая их жизнедеятельность. Выделяя кислоты, водоросли тем самым формируют среду,

пригодную для их жизнедеятельности. Сложные органические спирты входят в состав растительных эфирных масел, обладающих ингибирующим действием на другие виды и культуры водорослей. Алканы и алкены химически инертны, входят в состав клеточной стенки. Их повышенная концентрация также может обладать ингибирующим действием.

Таким образом, в составе клеточной массы культуры *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 было выявлено 17 органических веществ, идентифицированных с вероятностью более 50%, в составе культуральной жидкости – 31 органическое вещество. Обнаруженные вещества относятся к группам кислот, спиртов, углеводородов, альдегидов и другим. В основном, эти вещества являются первичными метаболитами [6].

Учитывая высокое разнообразие кислот в культуральной жидкости, можно предположить, что анализируемая культура находилась в состоянии начальной или стационарной фаз развития [22]. Кроме кислот, в среде хлореллы выявлены все известные для нее группы веществ [34], за исключением сложных – углеводов и витаминов.

Были обнаружены вещества с установленной биологической активностью, но их оказалось немного. Кроме того, были найдены вещества с умеренным токсическим действием, такие как фенол и его производные, диэтилфталат и ди(2-этилгексил)фталат, циклододекан.

Используемый метод химического анализа не позволяет определить концентрацию и количество выявленных веществ, поэтому можно лишь предположить, что эти вещества составляют «многокомпонентную систему биологически активных веществ» хлореллы [15].

3.2 Концентрация клеток в культуре

Размеры клеток штамма Chlorella vulgaris ИФР № С – 111, полученной у ООО НПО «Альгобиотехнология» изменились в пределах от 2 до 9 мкм, среднее значение ~~составило~~ 4,9*4,8 мкм. Численность колебалась в пределах от 13 до 118, но обычно составляла около 60 млрд. клеток/дм³ (млн. клеток/мл).

4. ХАРАКТЕРИСТИКА СИНЕЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ водоемов в окрестностях г. Екатеринбурга

4.1 Видовой состав синезеленых водорослей, вызывающих «цветение» воды в водоемах в окрестностях Екатеринбурга в 2011 – 2012 годах

В сентябре 2011, феврале и мае 2012 годов были отобраны пробы фитопланктона Верхне-Макаровского и Белоярского водохранилищ, в феврале, мае и июле 2012 – пробы фитопланктона Волчихинского водохранилища. На основании анализа состава альгоценозов был определен видовой состав синезеленых водорослей (таблица 1).

Таблица 1. Видовой состав синезеленых водорослей водоемов в окрестностях г.
Екатеринбурга в 2011 – 2012 годах

Наименование водоема, названия видов	Численность, млн. клеток/л	Биомасса, мг/л
Верхне-Макаровское водохранилище сентябрь 2011 (в пятне «цветения») Aphanizomenon flos-aquae Ralfs. Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk. Oscillatoria agardhii Gom. Oscillatoria sp. Woronichinia naegeliana (Ung.) Elenk.	115 6,4 163 74 3	6,73 0,18 8,0 0,11 0,04
февраль 2002 синезеленые не обнаружены		
май 2012 Oscillatoria agardhii Gom.	1,6	0,05
Белоярское водохранилище сентябрь 2011 (в пятне «цветения») Aphanizomenon flos-aquae Ralfs. Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk. Microcystis wesenbergii (Kom.) Kom.	1,8 980 46,5	0,18 85,35 4,75
февраль 2012 Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk.	1	0,06

май 2012 синезеленые не обнаружены		
Волчихинское водохранилище февраль 2012		
Aphanizomenon flos-aquae Ralfs.	7,1	0,32
Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk.	1,8	0,12
Oscillatoria sp.	7,7	0,01
май 2012		
Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk.	5	0,64
Oscillatoria agardhii Gom.	9,8	0,28
июль 2012 (в пятне «цветения»)		
Aphanizomenon flos-aquae Ralfs.	820	35,32
Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk.	17080	1257,47

Таким образом установлено, что «цветение» водоемов в окрестностях г. Екатеринбурга вызывают *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii*, *Microcystis wesenbergii*.

4.2 Определение характера веществ, содержащихся в синезеленых водорослях и выделяемых ими во внешнюю среду (на примере водорослей Белоярского водохранилища)

Методом хромато-масс-спектроскопии (Приложение А) было установлено наличие в клеточной массе синезеленых водорослей следующих веществ (приводятся соединения, вероятность идентификации которых выше 50%, метод не позволяет установить количественное содержание):

- Углеводороды – 2-метил-8-пропилдодекан, 7-метилпентадекан, нонацан;
- Кислоты – уксусная, пропановая, гексадекановая;
- Спирты – 2-фуранметанол, 9,12,15-октадекантриен-1-ол;
- Альдегиды – бензальдегид;
- Диэтилфталат, ацетамид, 1-гидроксипропанон-2, оксоциклогексан-2-он.

В воде, в которой находились синезеленые водоросли, были обнаружены следующие вещества:

- Кислоты – пропановая, бутановая, уксусная, пентановая, гептановая, октановая, нонановая, декановая, тетрадекановая, пентадекановая, гексадекановая, додекановая, пропеновая, бензойная;
- Углеводороды – тетрадекан, гексадекан, октадекен-1, октадекен-9, циклододекан, ундеан, 1-бутил-2-этилциклогексан, 1-метил-2-октилциклогексан, 2-изобутил-3-метил-пентен-1, 1,2,3-триметилциклогексан, циклотетрадекен, тетрадекен-5;
- Спирты - 2-этилгексанол-1, гептанол-1, октанол-1, тетрадеканол-1, додеканол-1, пропандиол-1,2, октанол-1, гексадеканол-1;
- Фенол, 2-гидроксибензальдегид, фталевый ангидрид, дибутилфталат, 9-октадеценамид, диизооктилфталат, ди-2-метилпропилфталат, 1-гидроксипропанон-2.

Среди веществ, выделяемых синезелеными водорослями, обнаружен токсичный фталевый ангидрид. Кроме того, были выделены вещества (спирты), обладающие запахом и привкусом – гептанол-1 и 2-этилгексанол-1. Бензойная кислота, встречающаяся в среде, обладает антисептическими свойствами.

Таким образом, в клеточной массе синезеленых водорослей из Белоярского водохранилища было выявлено (с вероятностью идентификации выше 50 %) 13 органических веществ, в воде, в которой они обитали – 43 органических вещества. Также, как и в культуре хлореллы, это были в основном первичные метаболиты. Веществ с установленной биологической активностью обнаружено незначительное количество. Среда, в которой обитали синезеленые водоросли, оказалась богаче по составу органических веществ, чем культуральная жидкость хлореллы: в ней оказалось больше кислот, углеводородов и спиртов. Также оказался богаче состав токсичных фталатов.

Полученные различия могут быть связаны с разной природой анализируемых объектов: в отличие от монокультуры хлореллы естественное сообщество синезеленых водорослей всегда (даже во время «цветения») состоит из более, чем одного вида, а состав органических веществ природной воды формируется не только синезелеными, но и другими группами водорослей, макрофитами и гидробионтами.

5. БИОТЕСТИРОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ

Chlorella vulgaris ИФР № С – 111

Метод биотестов применяется для обнаружения физиологически активных веществ, химическая природа которых чаще всего неизвестна. Наиболее часто применяются методы, основанные на ростовой реакции различных частей проростков растений [40]. Культура штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 была протестирована на прорастающих семенах редиса, а также на культурах синезеленых водорослей.

1) Биотест на прорастающих семенах редиса.

В таблице 2 приведены результаты теста, а также средние значения, значения погрешности и стандартного отклонения для контроля и опыта. На рисунках 1 и 2 изображены чашки Петри (опытные и контрольные) после завершения теста.

Погрешность измерения была рассчитана как среднее квадратическое отклонение по формуле:

$$S = \sqrt{\sum \frac{(x_i - x_{cp})^2}{n-1}} \quad (1);$$

Стандартное отклонение среднего – по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{cp})^2}{n}} \quad (2) [41].$$

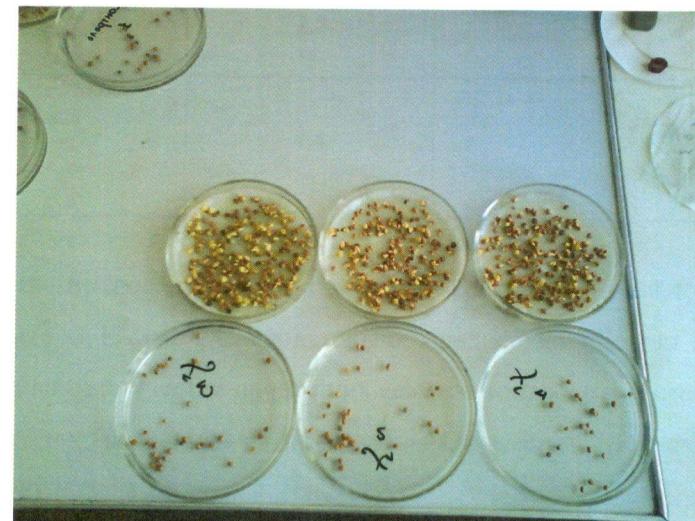


Рис. 1. Чашки Петри после проведения теста на семенах редиса (опыт в трех повторностях)

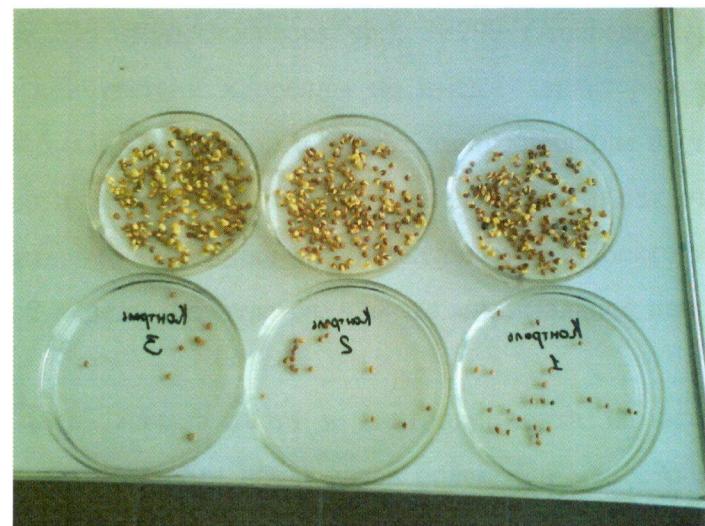


Рис. 2 Чашки Петри после проведения теста на семенах редиса (контроль в трех повторностях)

Таблица 2. Результаты биотеста на прорастающих семенах редиса

	Контроль		Опыт	
	Непроросшие	Проросшие	Непроросшие	Проросшие
1	23	177	19	181
2	17	183	35	165
3	8	192	30	170
среднее	16	184	28	172
погрешность измерения		7,5		8,1
стандартное отклонение среднего		4,4		4,8

Среднее количество проросших семян в контроле составило $184 \pm 4,4$, среднее количество проросших семян в опыте – $172 \pm 4,8$. Следовательно, среднее количество проросших семян в опыте отличается от среднего количества проросших семян в контроле и составляет от него 93%.

Таким образом, по результатам биотеста на семенах редиса отмечено слабое ингибирующее действие культуры хлореллы.

2) Тест для определения влияния культуры хлореллы на развитие синезеленых водорослей.

Тест был начат в начале марта (6.03.2012), окончен в апреле (24.04.2012). Протокол наблюдений за проведением теста приведен в Приложении В.

Через неделю после начала теста, были выявлены явные различия в развитии 4 исследуемых культур синезеленых водорослей в присутствии хлореллы по сравнению с

контролем. Культуры № 535 (*Synechococcus* sp.), №799 (*Anabaena spiroides*), №616 (*Oscillatoria subbrevis*) в присутствии хлореллы не имеют характерного сине-зеленого оттенка, а культура №1415 (*Oscillatoria* sp.) в присутствии хлореллы не только не имеет сине-зеленого оттенка, но и не прикрепилась к стенке пробирки, как это произошло в контроле. Следует отметить, что в практике ведения культур цианобактерий контрольным сроком считается срок в 2 недели – считается, что это минимальное необходимое время для прироста культуры.

Через 2 недели после начала теста в контроле почти во всех пробирках с нитчатыми синезелеными водорослями наблюдался более или менее обильный рост на стенках. В опыте роста на стенках не наблюдалось, за исключением культур № 660 и 1416, для которых наблюдался обильный рост на стенках, и № 303, для которой был характерен небольшой рост на стенках пробирки. Для культур одноклеточных колониальных № 535 (*Synechococcus* sp.) и № 972 (*Microcystis aeruginosa*), растущих в толще воды, разница между контролем и опытом не была заметна.

Через 3 недели в опыте почти во всех пробирках наблюдался рост, но более слабый, чем в контроле. Для культур № 729 (в опыте) и № 1414 (в опыте и контроле) было характерно интересное явление: масса водорослей была сконцентрирована в виде «клубка».

Через месяц от начала теста в 6 из 11 тестовых культур синезеленых водорослей в опыте наблюдался рост на стенке нитчатых синезеленных водорослей, при этом, во всех 11 в присутствии хлореллы наблюдалось отличие от контроля (в опыте синезеленые водоросли развивались хуже).

В конце опыта, через 7 недель от начала теста, из 11 тестовых культур в 3 случаях в присутствии хлореллы синезеленые водоросли полностью погибли, оставаясь живыми в контроле, в 4 случаях они достигли того же уровня развития, что и в контроле. Из оставшихся вариантов только в одном было видно, что в присутствии хлореллы синезеленые водоросли развиваются хуже, чем в контроле. В двух вариантах (с участием планктонных синезеленых водорослей, культуры № 535 *Synechococcus* sp. и № 972 *Microcystis aeruginosa*) результат был неявным – по внешнему виду пробирки с опытом и контролем выглядели одинаково. В одном случае культура синезеленых водорослей погибла и в опыте, и в контроле (№ 799).

Результаты дополнительного полуколичественного теста также оказались разными для культур № 972 и 535 (таблица 3). Через 2 недели и месяц от начала теста плотность культуры № 972 (*Microcystis aeruginosa*) в опыте была ниже, чем в контроле, и снижалась с течением времени. При этом, плотность культуры № 535 (*Synechococcus* sp.) спустя 2 недели от начала теста в контроле и опыте находилась на одном уровне, тогда как еще

через 2 недели плотность культуры в опыте превышала плотность в контроле. Можно предположить, что культура штамма Chlorella vulgaris ИФР № С – 111 оказывала на культуру № 972 ингибирующее, а на культуру № 535 стимулирующее действие.

Таблица 3. Результаты дополнительного теста с культурами № 972 и № 535

Дата проверки	972 опыт	972 контроль	535 опыт	535 контроль
14.06	2,2 млрд кл./л	4,6 млрд кл./л	38 млрд кл./л	43 млрд кл./л
27.06	0,8 млрд кл./л	5,3 млрд кл./л	75 млрд кл./л	40,8 млрд кл./л

В тесте с материалом из Волчихинского и Верхне-Макаровского водохранилищ были обнаружены непустые акинеты *Aphanizomenon flos-aquae*, однако добиться их прорастания не удалось и спустя месяц от начала тестирования.

Таким образом, в результате теста установлено, что синезеленые водоросли по-разному реагируют на присутствие культуры штамма Chlorella vulgaris ИФР № С – 111. Среди изученных культур наиболее отрицательное влияние хлорелла оказала на культуры: № 657 (*Oscillatoria af. splendida*), 729 (*Oscillatoria sp.*), 799 (*Anabaena spiroides*), 1414 (*Oscillatoria sp.*). Остальные культуры смогли через некоторое время адаптироваться к ее присутствию и даже начать развиваться. Было обнаружено, что культура хлореллы оказывала на культуру № 972 (*Microcystis aeruginosa*) ингибирующее, а на культуру № 535 (*Synechococcus sp.*) стимулирующее действие.

6. ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ИЗУЧЕНИЮ НЕСКОЛЬКИХ ГИПОТЕЗ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ХЛОРЕЛЛЫ *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 НА СИНЕЗЕЛЕНЫЕ ВОДОРОСЛИ

Для эксперимента по проверке разных гипотез взаимодействия культуры штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 с сообществами синезеленых водорослей была отобрана вода с массой водорослей разной концентрации из пятен сгона в сентябре – октябре 2011 года на Верхне-Макаровском (27 сентября) и Белоярском водохранилищах (4 октября).

Вода с синезелеными водорослями с добавлением заданного количества суспензии хлореллы (общий объем жидкости 300 мл) была разлита по коническим колбам объемом 500 мл, закрытых ватно-марлевыми пробками. Плотность засеваемой хлореллы составила 28,6 млрд кл/л (млн кл / мл).

Варианты проведения эксперимента:

- Контроль: вода с синезелеными водорослями без хлореллы 300 мл;
- 1 - 150 мл воды с синезелеными водорослями и 150 мл культуры хлореллы (условное соотношение 1 : 1);
- 2 - 270 мл воды с синезелеными и 30 мл культуры хлореллы (условное соотношение 1 : 10);
- 3 - 299 мл воды с синезелеными водорослями и 1 мл культуры хлореллы (условное соотношение 1 : 100);
- 4 - 270 мл воды с синезелеными водорослями и 30 мл культуральной жидкости хлореллы без клеток;
- 5 - 270 мл воды с синезелеными водорослями и 30 мл жидкости с перетертоей хлореллой.

Вариант 1 предполагает проверку гипотезы о конкуренции синезеленых и хлореллы; варианты 2, 3 – гипотезы о воздействии малого количества культуры хлореллы; варианты 4, 5 – гипотезы о влиянии на синезеленые водоросли биологически активных веществ, выделяемых хлореллой.

Все варианты были представлены в двух линиях: с водой Белоярского (код Б) и с водой Верхне-Макаровского (код ВМ) водохранилища, в трех повторностях, контроль в двух повторностях.

Экспериментальные сосуды экспонировались при естественном освещении на протяжении месяца (с 7 октября по 7 ноября 2011 года). По мере подсыхания воды в колбы добавлялось небольшое количество среды Чу-10 [4].

Пробы отбирались 7.10, 11.10, 14.10, 17.10, 7.11 2011 года. В каждой пробе определялись численность синезеленых водорослей и хлореллы. Численность синезеленых водорослей, которая была взята как зависимая переменная, была стандартизована при помощи поправочных коэффициентов, учитывающих степень разбавления. Для анализа данных были взяты средние значения этих показателей.

Состав синезеленых водорослей в Белоярском водохранилище:

Aphanizomenon flos-aquae Ralfs.

Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk.

Microcystis wesenbergii (Kom.) Kom.

Состав синезеленых водорослей в Верхне-Макаровском водохранилище:

Aphanizomenon flos-aquae Ralfs.

Microcystis aeruginosa (Kuts.) Elenk

Oscillatoria agardhii Gom.

Oscillatoria sp.

Woronichinia naegeliana (Ung.) Elenk.

На рисунках 3 и 4 приведен внешний вид сосудов всех вариантов двух линий спустя 2 недели после начала эксперимента.

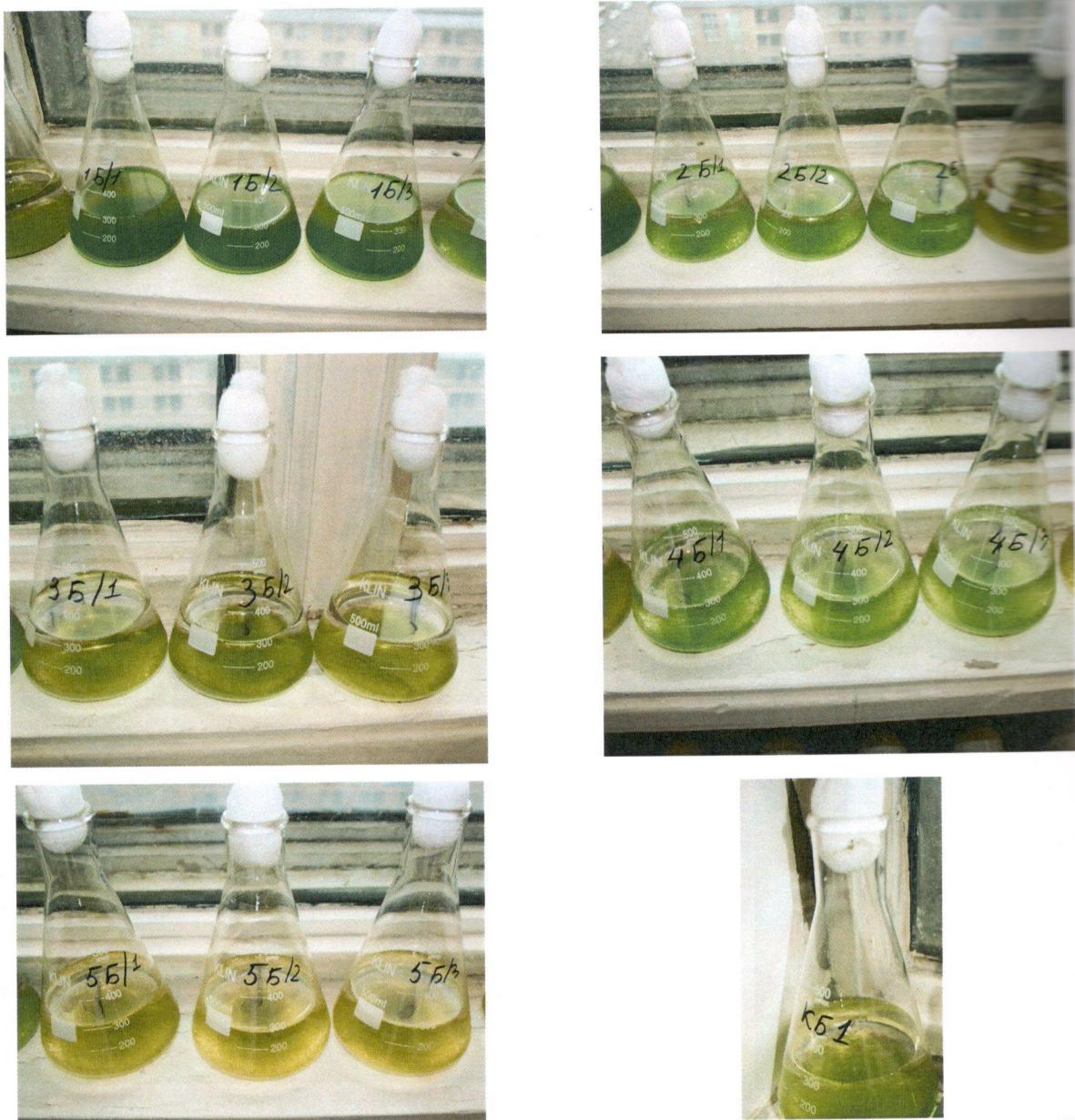


Рис. 3. Внешний вид экспериментальных сосудов линии эксперимента с водой Белоярского водохранилища (варианты 1, 2, 3, 4, 5 и контроль)

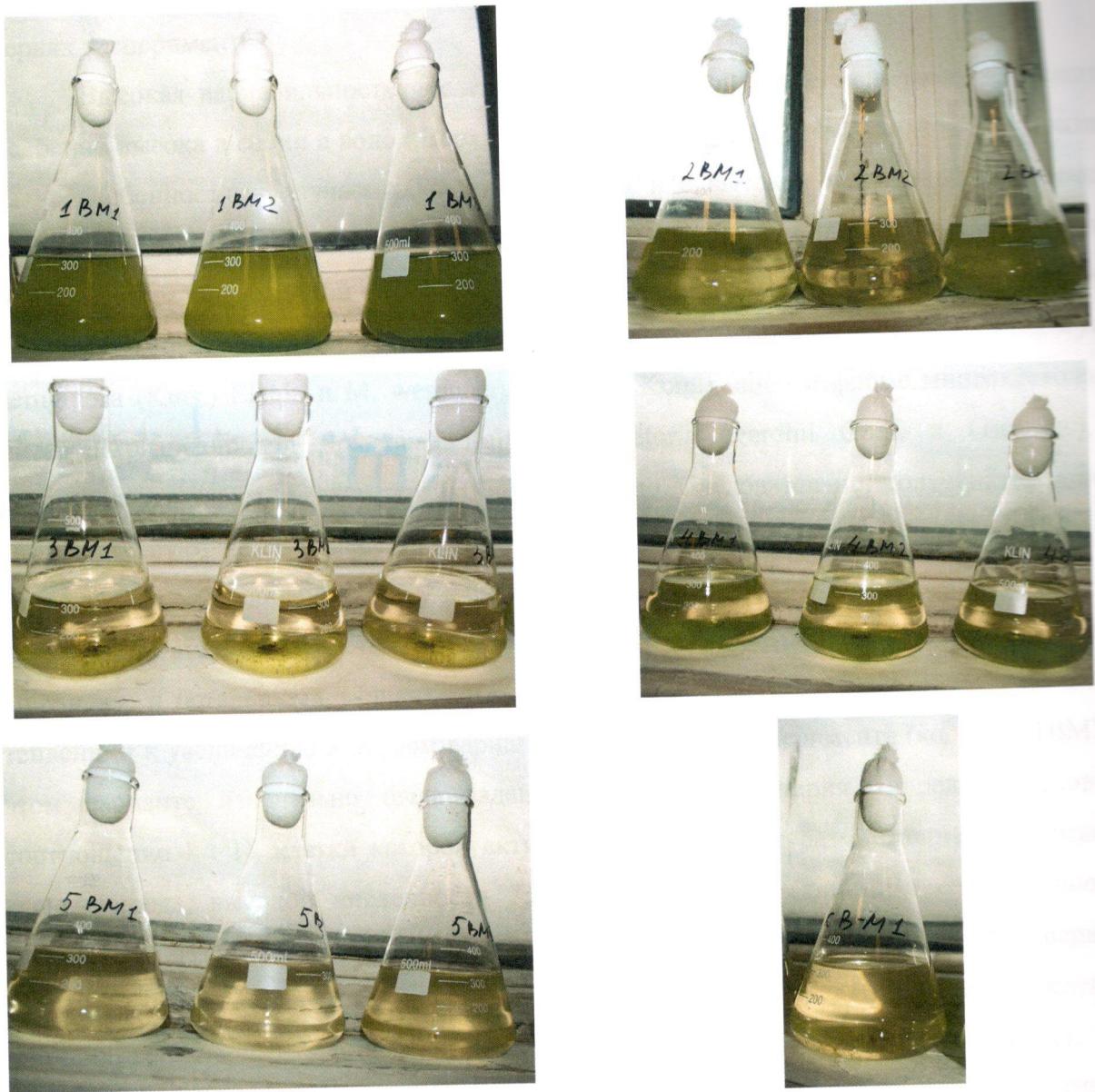


Рис. 4. Внешний вид экспериментальных сосудов линии эксперимента с водой Верхне-Макаровского водохранилища (варианты 1, 2, 3, 4, 5 и контроль)

На рисунках 5 и 6 показана динамика численности синезеленых водорослей в обеих сериях эксперимента.

Высокая вариабельность численности в начальной точке эксперимента (которая особенно высока в серии с водой Верхне-Макаровского водохранилища, код ВМ) связана как с особенностями изучаемых водорослей, так и с высокой погрешностью прямого счетного метода определения численности. В отличие от одноклеточной хлореллы, равномерно распределенной в среде, изучаемые синезеленые водоросли существуют либо в форме многоклеточных скоплений, называемых колониями (например, *Microcystis aeruginosa* (Kuts.) Elenk. и *M. wesenbergii* (Kom.) Kom.), либо в форме многоклеточных нитей (*Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs., *Oscillatoria agardhii* Gom. и *Osc. sp.*), и распределены, таким образом, крайне неравномерно. Следовательно, полученные данные свидетельствуют не об изменении абсолютной численности синезеленых водорослей, а о тенденциях к ее увеличению или уменьшению.

1) Данные, представленные на рисунках 5 и 6 показывают, что, по сравнению с контролем и остальными вариантами, численность синезеленых была ниже и не имела тенденции к увеличению в первом варианте обеих серий эксперимента (код 1Б и 1ВМ). В этом варианте изначально была задана высокая концентрация хлореллы (условное соотношение 1 : 1), клетки которой активно вегетировали и размножались, достигая, в свою очередь, высокой численности 7,5 – 8 млрд. кл./л (динамика ее численности отображена на рисунках 7 и 8). Внешний вид экспериментальных сосудов первого варианта заметно отличался от других (рис. 3 и 4) – вода приобрела насыщенный зеленый оттенок, характерный для суспензии хлореллы. Под микроскопом было видно, что колонии синезеленых водорослей полуразрушены (по мере проведения эксперимента количество полуразрушенных колоний увеличивалось, а в конце эксперимента практически все колонии потеряли свой натуральный вид).

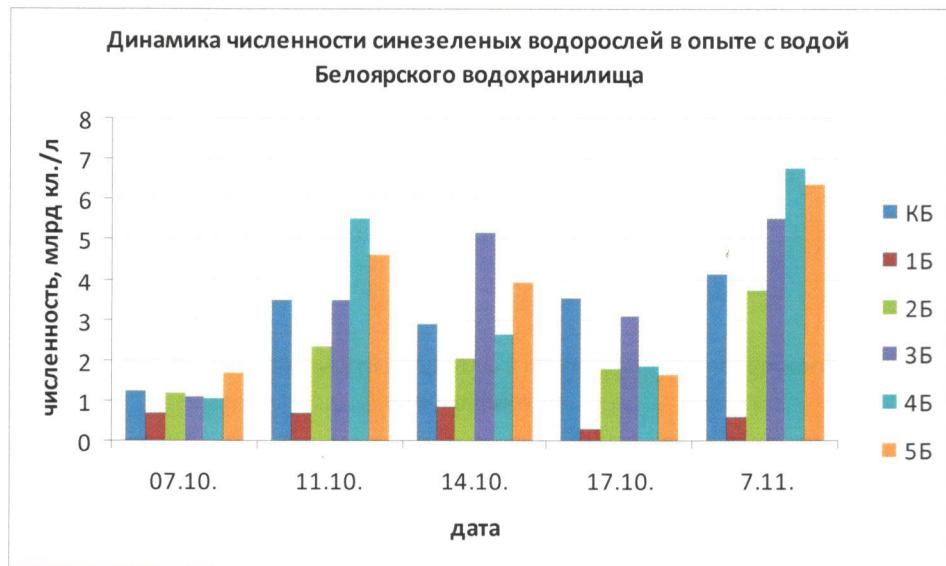


Рис. 5. Результаты эксперимента в линии с водой Белоярского водохранилища



Рис. 6. Результаты эксперимента в линии с водой Верхне-Макаровского водохранилища

2) Во втором варианте (код 2Б и 2ВМ), в котором было смоделировано условное соотношение – культура хлореллы к суспензии синезеленых водорослей 1 : 10, результаты не были такими однозначными.

В линии с водой Белоярского водохранилища (код 2Б) во всех контрольных точках численность синезеленых была ниже, чем в контроле, при этом ее динамика повторяла динамику численности синезеленых водорослей в контроле. Плотность хлореллы (рисунок 7) во второй контрольной точке увеличилась по сравнению с началом эксперимента и составила менее 2 млрд кл./л, а затем постепенно снижалась.

В линии с водой Верхне-Макаровского водохранилища (код 2ВМ) численность синезеленых 11.10 и 14.10 была ниже, а 17.10 и 7.11 – выше, чем в контроле. При этом сначала наблюдается резкое снижение численности, а потом она снова достаточно резко увеличивается. Численность клеток хлореллы (рисунок 8) здесь также сначала росла, превысив 2 млрд кл./л, а затем снижалась.



Рис. 7. Изменение численности хлореллы в линии эксперимента с водой Белоярского водохранилища



Рис. 8. Изменение численности хлореллы в линии эксперимента с водой Верхне-Макаровского водохранилища

3) В третьем варианте эксперимента (код 3Б и 3ВМ) была проверена гипотеза о воздействии малого количества культуры хлореллы (условное соотношение 1 : 100). Здесь результаты оказались еще более противоречивыми, чем во втором.

В линии с водой Белоярского водохранилища (3Б) численность синезеленых в опыте находилась на уровне контроля почти на протяжении всего эксперимента (7.10, 11.10, 17.10), иногда превышая его (14.10 и 7.11). Динамика численности синезеленых в опыте при этом не в точности повторяла динамику в контроле: в отличие от контроля, с 11.10 по 14.10 она повысилась, а с 14.10 по 17.10 – понизилась. Численность хлореллы (рисунок 7) на фоне сообщества водорослей была практически незаметна.

В линии с водой Верхне-Макаровского водохранилища (3ВМ), где начальная численность синезеленых водорослей была выше, чем в контроле, к третей контрольной точке 14.10 она резко увеличилась и достигла максимального значения. Далее численность синезеленых водорослей резко упала, и к концу эксперимента была почти незаметна. Численность хлореллы на протяжении всего эксперимента в этом варианте была очень низкой.

4) В четвертом варианте с добавлением культуральной жидкости хлореллы в обеих линиях (4Б и 4ВМ) не было обнаружено ее ингибирующего действия на синезеленые водоросли.

Так, в линии с водой Белоярского водохранилища численность синезеленых водорослей в опыте (4Б) была заметно ниже, чем в контроле, только в одной точке (17.10), в двух точках она была примерно на уровне контроля (7.10, 14.10), а в двух – превышала численность в контроле (11.10 и 7.11). При этом, в конце эксперимента именно в этом варианте численность синезеленых водорослей была максимальной.

В линии с водой Верхне-Макаровского водохранилища в четвертом варианте численность синезеленых водорослей почти во всех контрольных точках находилась примерно на одном уровне с контролем, за исключением 17.10, когда она заметно превышала контроль.

5) В пятом варианте (5Б и 5ВМ) в экспериментальные сосуды была добавлена жидкость с разрушенными клетками хлореллы. Однако, анализ показал, что перетирания в ступке со стеклянным порошком для полного разрушения клеток недостаточно: целые жизнеспособные клетки сохранились, их плотность была сопоставима с плотностью клеток во втором варианте эксперимента (рисунки 7 и 8).

Тем не менее, в линии с водой Белоярского водохранилища (код 5 Б, рисунок 5) в этом варианте численность синезеленых водорослей изменилась сходным образом с вариантом 4 Б (с добавлением культуральной жидкости), в то время как в параллельной

линии (5ВМ, рисунок 6) ко второй дате отбора численность синезеленых резко снизилась и далее продолжала падать (и этим динамика отличалась от всех остальных вариантов).

Две линии эксперимента имели и еще одно значимое различие: в линии с водой Верхне-Макаровского водохранилища было обнаружено увеличение численности зеленых водорослей (рисунок 9), в основном, за счет развития хлорококковых (группы водорослей, к которым принадлежит и сама хлорелла). Сначала появились, а потом размножились такие виды, как *Dictyosphaerium pulchellum* Wood, *Scenedesmus disciformis* (Chod.) Fott et Kom., *Sc. denticulatus* Lagerch., *Sc. quadricauda* (Turp.) Breb. Это изменение было заметно невооруженным глазом: на рис. 10 показан внешний вид сосудов этой линии в конце эксперимента. По всей вероятности, в начальной точке эксперимента эти виды находились в подавленном состоянии [15], а по мере снижения физиологической активности синезеленых водорослей, перешли в активное состояние. Можно предположить, что это естественный процесс, так как это имело место и в контроле (рисунок 9).

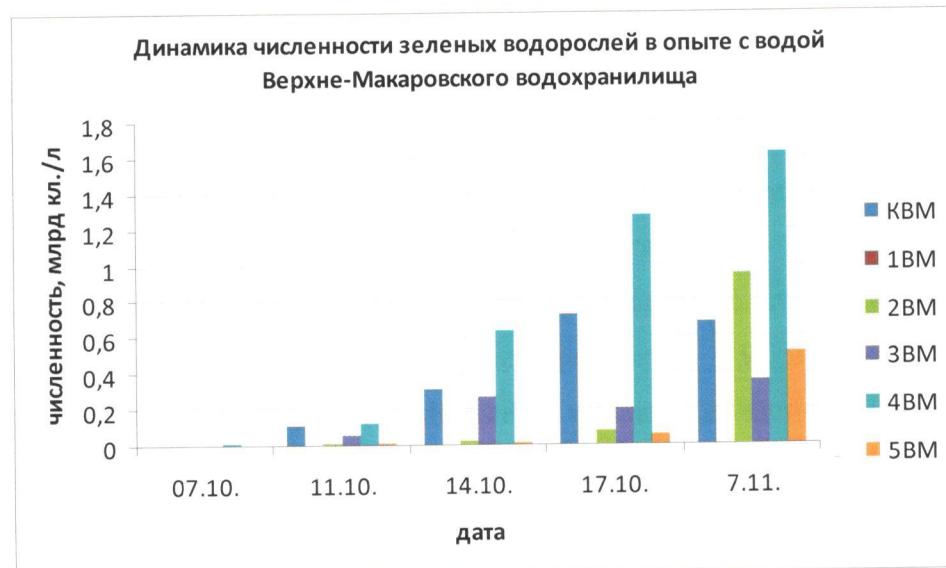


Рис. 9. Развитие зеленых водорослей в контроле и пяти вариантах эксперимента в линии с водой Верхне-Макаровского водохранилища



Рис. 10. Внешний вид экспериментальных сосудов с водой Верхне-Макаровского водохранилища в конце эксперимента

В первом варианте (1BM), при большой концентрации клеток хлореллы, зеленые водоросли не развивались. Во втором варианте (2BM), при условном соотношении 1 : 10, на протяжении почти всего эксперимента численность зеленых водорослей была низкой, но в конце значительно увеличилась. При условном сочетании 1 : 100 (вариант 3BM) плотность зеленых водорослей сначала была более заметна, чем во втором варианте, но к концу эксперимента значительно не увеличилась. Самый яркий стимулирующий эффект на развитие зеленых водорослей оказала культуральная жидкость хлореллы – в этом варианте (4BM) численность зеленых водорослей выросла настолько значительно, что достигла уровня развития синезеленых водорослей (рисунки 6 и 9), и эта разница была хорошо заметна визуально (рисунок 10). В пятом варианте с частично разрушенной клеточной массой хлореллы рост зеленых водорослей был, но незначительный, более заметный к концу эксперимента.

Таким образом, в эксперименте по изучению разных механизмов действия культуры штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 на синезеленые водоросли выявлено, что наиболее эффективно хлорелла подавляет их развитие в большой концентрации, когда плотности сопоставимы, или плотность хлореллы превышает плотность синезеленых водорослей. При таких условиях хлорелла успешно размножается и подавляет развитие не только синезеленых, но и зеленых водорослей. В остальных соотношениях действие более непредсказуемо, и по всей вероятности, зависит от общего состава, плотности и состояния альгоценоза. В том случае, если есть предпосылки, вещества, которые содержатся в культуральной жидкости хлореллы могут стимулировать развитие других групп водорослей (например, зеленых хлорококковых).

7. ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПОТРЕБЛЕНИЯ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КУЛЬТУРОЙ ХЛОРЕЛЛЫ *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 В СРАВНЕНИИ С СИНЕЗЕЛЕНЫМИ ВОДОРОСЛЯМИ

Цель:

Исследовать способность хлореллы конкурировать за биогенные вещества (нитрат-ион, нитрит-ион, ион аммония, азот органический, фосфор органический, фосфат-ион) с синезелеными водорослями при содержании в изолированных аквариумах с определенной концентрацией соединений азота и фосфора.

Задачи:

- определить скорость поглощения биогенных веществ (нитрат-ион, нитрит-ион, ион аммония, азот органический, фосфор органический, фосфат-ион) клетками хлореллы и синезеленых водорослей;
- изучить динамику численности клеток синезеленых водорослей и хлореллы в эксперименте по поглощению биогенных веществ.

Методика эксперимента

Эксперимент по исследованию поглощения биогенных веществ хлореллой и синезелеными водорослями проводился в трех аквариумах:

1. Аквариум 30 л воды + хлорелла;
2. Аквариум 30 л воды + синезеленые водоросли;
3. Аквариум 25 л воды (контроль).

В эксперименте использовалась отстоянная водопроводная вода. Синезеленые водоросли были отобраны в период цветения из Волчихинского водохранилища, исходная плотность суспензии составляла 18 миллиардов клеток/дм³. Исходная плотность суспензии хлореллы составляла 13 миллиардов клеток/дм³.

В эксперименте была создана определенная концентрация хлореллы и синезеленых водорослей путем разбавления исходных суспензий.

После разбавления суспензии клеток водорослей был проведен анализ концентрации соединений азота и фосфора, после чего в аквариумы было добавлено необходимое количество солей (KNO_3 и KH_2PO_4) для создания концентрации NO_3^- около 30 мг/дм³, PO_4^{2-} около 1 мг/дм³.

Вода на анализ отбиралась в количестве 800 мл на 1, 3, 7, 9 и 13 сутки эксперимента. Перед проведением химического анализа суспензия клеток подвергалась фильтрованию. Производился подсчет плотности клеток хлореллы и синезеленых водорослей.

Расчет скорости поглощения биогенов производился по следующей формуле:

$$U = \frac{\frac{X_n - X_{n+1}}{T}}{\frac{N_n + N_{n+1}}{2}} \quad (3)$$

Где U – скорость поглощения биогенов клетками водорослей, мг/тыс. клеток в сутки; X_n и X_{n+1} – концентрации биогенов в предыдущий и последующий день отбора, мг/дм³; T – время между днями отбора проб на концентрации биогенов, сутки; N_n и N_{n+1} – плотность культуры клеток водорослей предыдущий и последующий день отбора, тысяч клеток/ дм³.

При этом, если $U > 0$, происходит поглощение биогенных элементов, если $U < 0$, имеет место выход биогенных элементов в воду.

Результаты эксперимента

Численность клеток хлореллы и синезеленых водорослей в эксперименте изменялась с течением времени (рис. 11). В начале эксперимента плотность клеток хлореллы оказалась выше (около 350 тысяч клеток/ дм³), чем плотность клеток синезеленых водорослей (около 150 тысяч клеток/ дм³). В первые 3 суток концентрация клеток хлореллы возросла до 540 тысяч клеток/ дм³, а затем, с 3 по 13 сутки резко снизилась до уровня 1 тысяча клеток/ дм³. Концентрация клеток синезеленых не превышала начального уровня, прослеживалась тенденция к снижению численности клеток водорослей, на тринадцатые сутки в аквариуме с синезелеными водорослями были обнаружены клетки зеленых водорослей (2,5 тысячи клеток/ дм³).

В суспензии водорослей следует принять во внимание следующие процессы, способные повлиять на концентрацию биогенов в среде:

- 1) Поглощение клетками водорослей биогенных элементов;
- 2) Выход биогенных элементов в водную среду при отмирании и разрушении клеток водорослей, разложение сложных органических веществ с высвобождением ионов аммония, нитратов, нитритов, фосфатов;
- 3) Деятельность нитрифицирующих бактерий, окисляющих аммиак (ион аммония) до нитритов, а затем до нитратов;

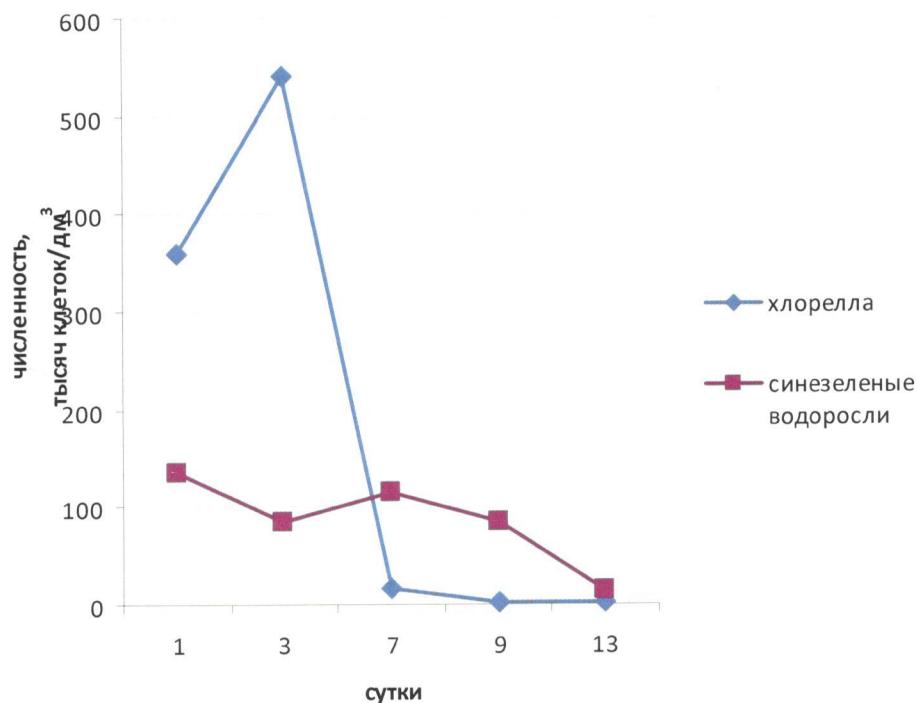


Рис. 11. Динамика численности клеток хлореллы и сине-зеленых водорослей в эксперименте.

В материальных балансах водоемов учитываются соотношения между содержанием различных соединений биогенных элементов. За основную величину в этих расчетах принимается суммарное содержание всех присутствующих соединений биогенов, выраженное величиной общего содержания элемента.

Общее содержание азота в аквариуме с хлореллой колебалось на уровне 10 -12 мг/дм³, в аквариуме с синезелеными водорослями и в контроле этот показатель был сходным и составлял от 7 до 9 мг/дм³ (рис. 12а).

Общее содержание фосфора в аквариуме с хлореллой возрастало с 3 по 13 сутки с 2,23 до 3,8 мг/дм³ (рис. 12б), что совпало со снижением численности клеток водоросли. В аквариумах с синезелеными водорослями и в контроле концентрация общего фосфора слабо росла с 1 по 7 сутки, а затем снизилась (рис. 12б).

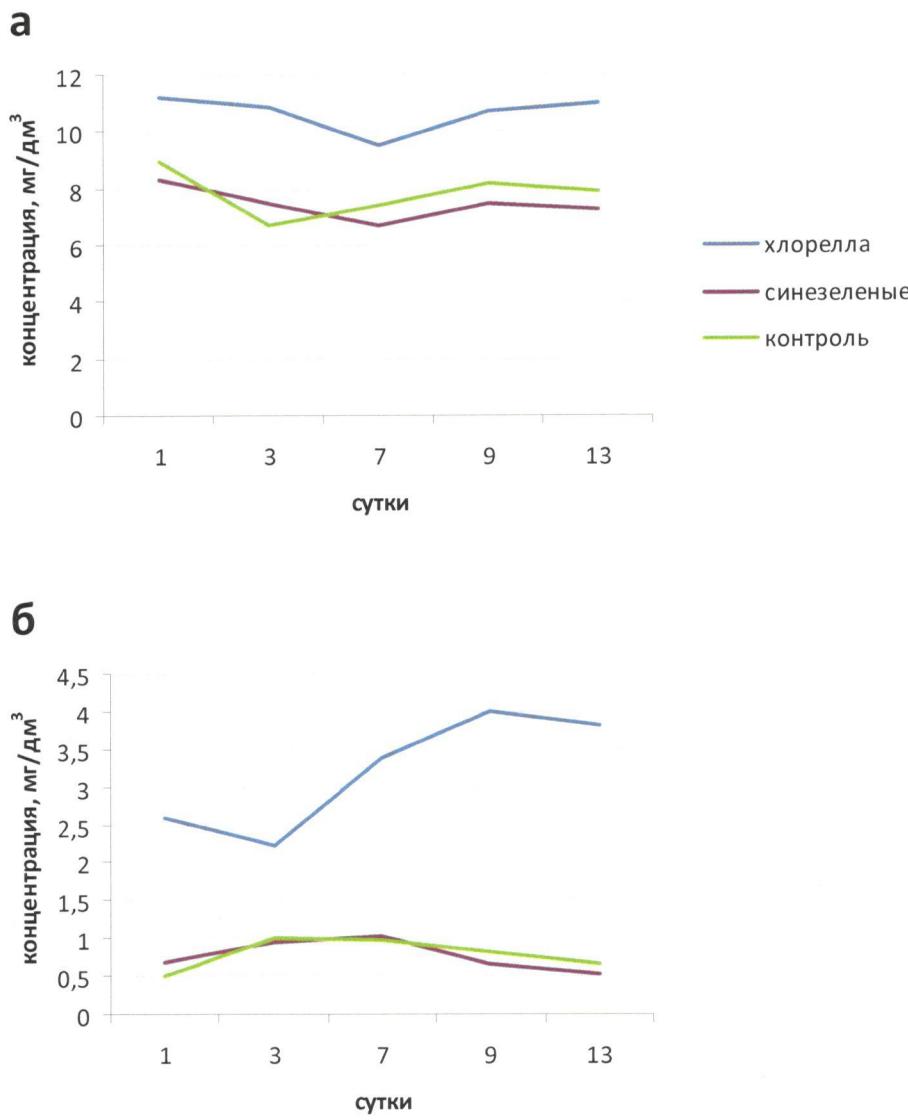


Рис. 12. Изменение концентрации азота общего (а) и фосфора общего (б) в аквариумах с суспензией хлореллы, синезеленых водорослей и контрольном аквариуме.

В эксперименте показано, что скорость поглощения соединений фосфора клетками хлореллы (рис. 13а) выше, чем клетками синезеленых водорослей (рис. 13б). В суспензии хлореллы преобладает выделение соединений азота в среду (средняя скорость выхода 0,025 мг/сутки на 1000 клеток). В суспензии синезеленых водорослей средняя скорость поглощения биогенов мала: 0,0007 мг азота/сутки на 1000 клеток, 0,0002 мг фосфора/сутки на 1000 клеток).

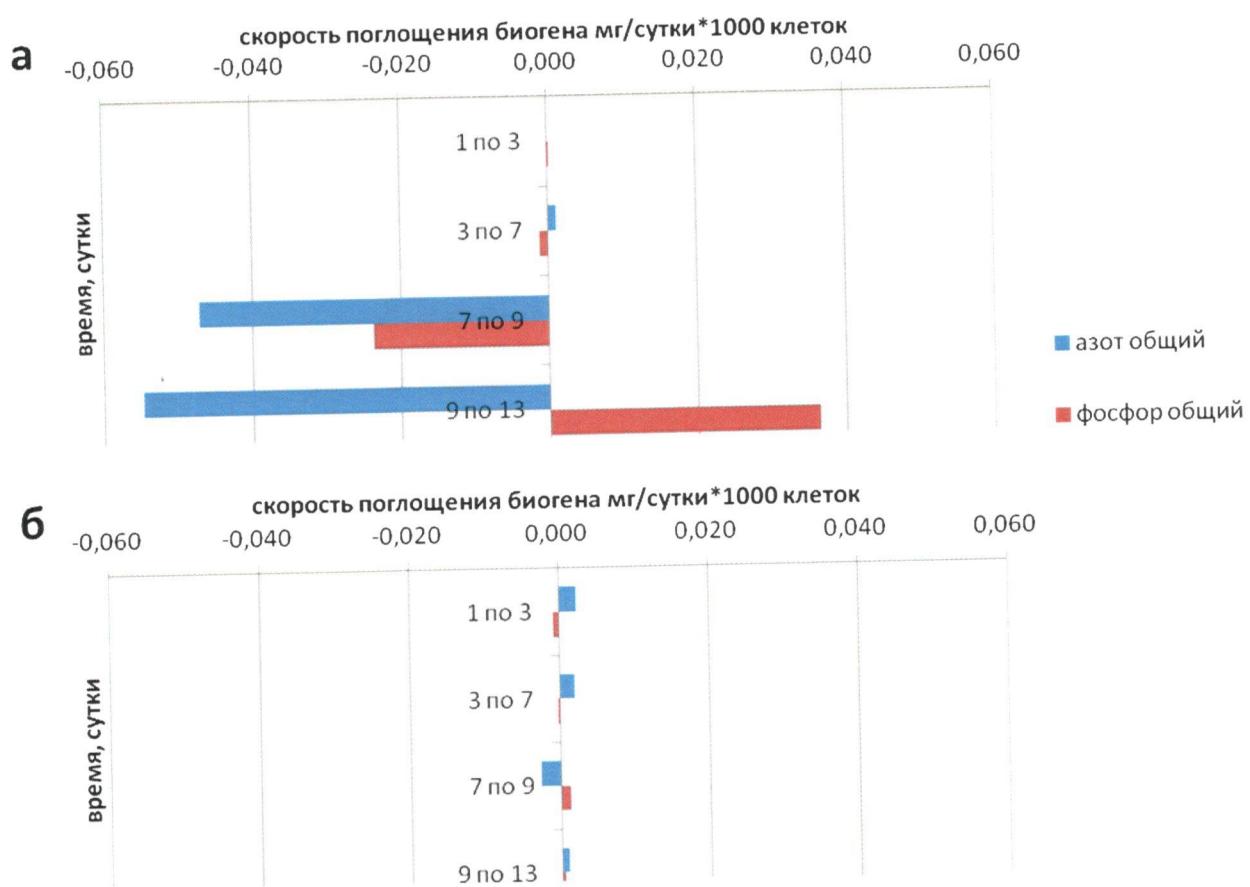


Рис. 13. Скорость поглощения биогенных элементов (азота общего и фосфора общего) клетками хлореллы (а) и синезеленых водорослей (б).

В эксперименте для создания определенной концентрации азота использовался нитрат калия. Но, так как для введения в среду водорослей применялись концентрированные суспензии, в воду попали также ионы аммония и нитриты, которые являются естественным компонентом природных вод, населенных микроорганизмами.

На протяжении всего эксперимента концентрация нитратов, нитритов и ионов аммония возрастила как в аквариуме с хлореллой, так и в аквариуме с синезелеными водорослями (рис. 14). Вероятно, соединения азота высвобождались при разложении массы погибших водорослей. В контрольном варианте рост концентрации нитратов (с 21,2 до 27,5 мг/дм³) может быть связан с окислением ионов аммония и нитритов, которые могли попасть в среду с отстоянной водопроводной водой.

Рост концентрации нитратов, нитритов и аммоний-иона был больше в аквариуме с хлореллой. На 13-е сутки концентрация нитратов возросла на 20,4 мг/дм³, нитритов – на 0,248 мг/дм³, аммоний-иона – на 0,423 мг/дм³. В аквариуме с синезелеными водорослями эти показатели значительно ниже: концентрация нитратов возросла на 16,7 мг/дм³, нитритов – на 0,114 мг/дм³, аммоний-иона – на 0,145 мг/дм³.

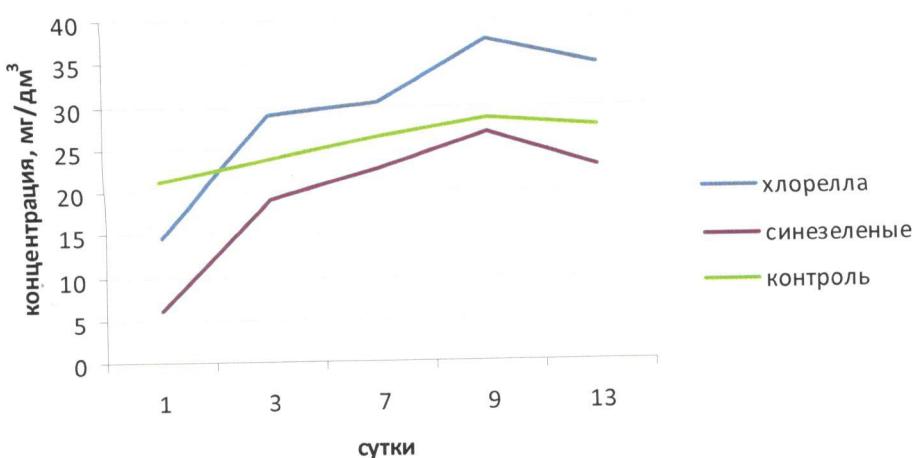
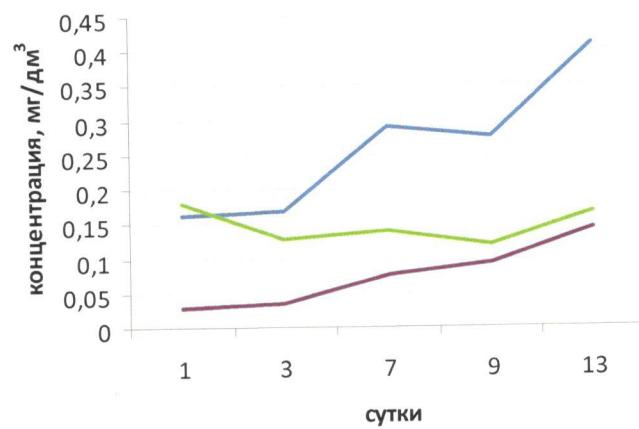
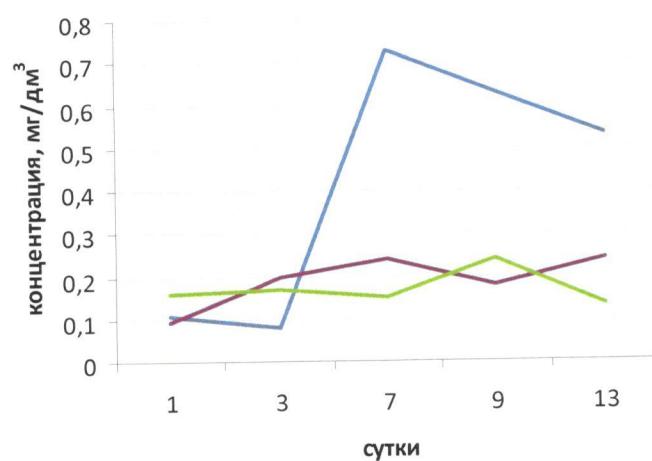
а**б****в**

Рис. 14. Изменение концентрации нитратов (а), нитритов (б) и аммоний-иона (в) в аквариумах с суспензией хлореллы, синезеленых водорослей и контрольном аквариуме.

Скорость поглощения нитрат-иона клетками хлореллы выше, чем клетками синезеленых водорослей (рис. 15). Наибольшая скорость поглощения нитратов клетками хлореллы была отмечена с 9 по 13 сутки, когда численность живых клеток хлореллы достигла минимума (рис. 15а). В суспензии синезеленых водорослей преобладал выход нитрат-иона из клеток (рис. 15б).

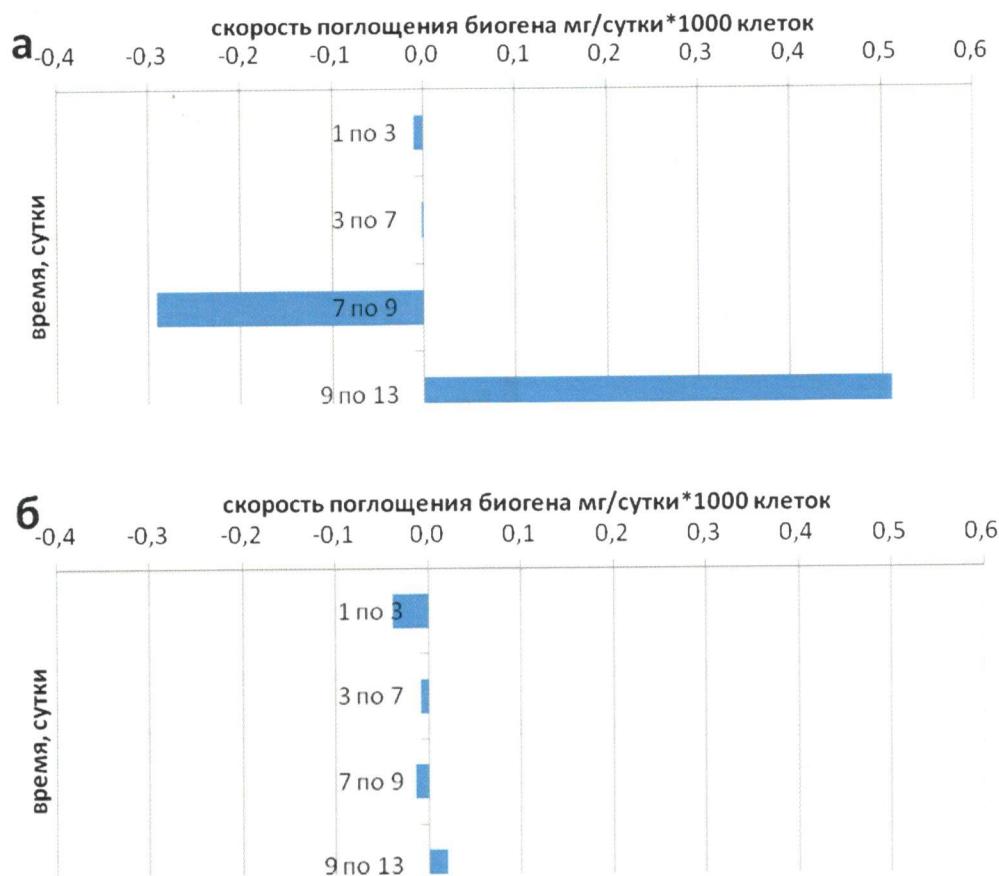


Рис. 15. Скорость поглощения нитрат-иона клетками хлореллы (а) и синезеленых водорослей (б).

Скорость поглощения нитрит-иона и аммоний-иона клетками хлореллы выше, чем клетками синезеленых водорослей (рис. 16). С 7 по 13 сутки возрастала скорость поглощения аммоний-иона клетками хлореллы (рис. 16а). В суспензии синезеленых водорослей преобладал выход нитрит-иона и аммоний-иона из клеток (рис. 16б).

В аквариуме с хлореллой возрастала концентрация фосфат-иона, преобладал выход иона из клеток (рис. 17). В аквариуме с синезелеными водорослями и в контроле концентрация фосфат-иона снижалась, возрастала скорость поглощения биогенного элемента.

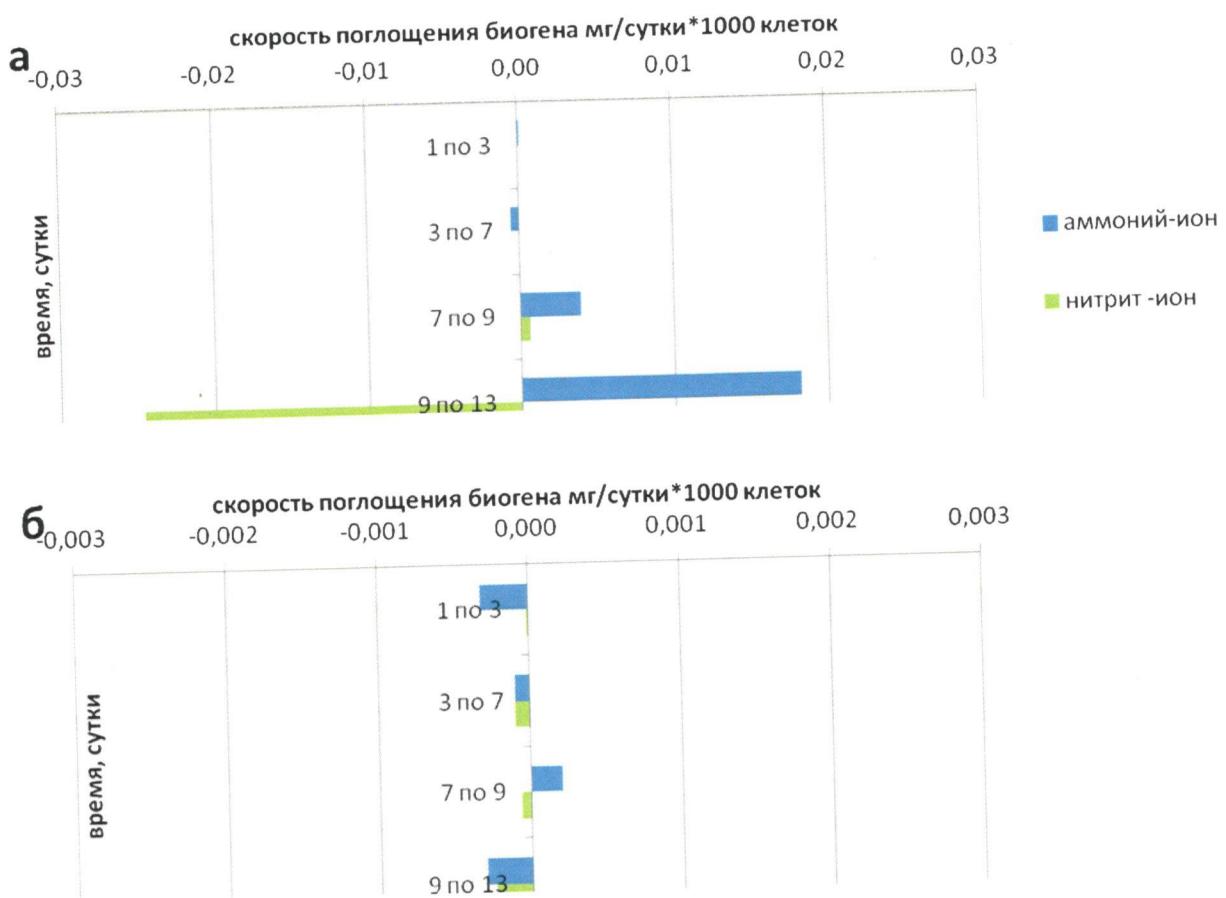


Рис. 16. Скорость поглощения биогенных элементов (нитрит-иона и аммоний-иона) клетками хлореллы (а) и синезеленых водорослей (б).

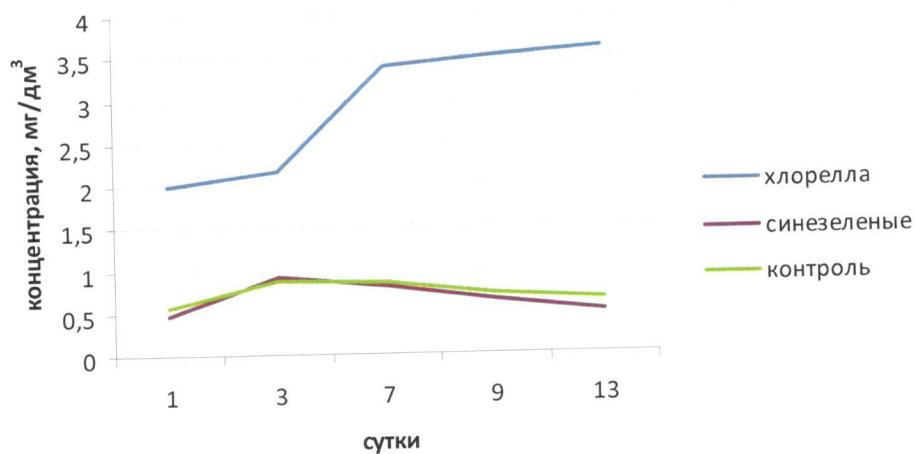


Рис. 17. Изменение концентрации фосфат-иона в аквариумах с суспензией хлореллы, синезеленых водорослей и контрольном аквариуме.

Органический азот – это азот, входящий в состав органических веществ: белков, аминокислот, аминов, амидов, мочевины. Значительная часть азотсодержащих органических соединений поступает в природные воды в процессе отмирания организмов, главным образом фитопланктона, и распада их клеток. Органические соединения фосфора – это в основном белки, нуклеотиды, фосфопротеиды. Органические соединения этих элементов попадают в воду в результате прижизненной деятельности микроорганизмов, а также при разложении отмерших клеток.

На рисунке 18а показано, что концентрация органических форм азота снижается в суспензии хлореллы, синезеленых водорослей и в контроле. Происходит разложение высокомолекулярных соединений, при этом возрастает концентрация аммоний-иона, нитритов и нитратов. Максимальная скорость выхода органических форм азота совпала с падением концентрации живых клеток хлореллы (9-13 сутки) (рис. 19). Концентрация органических форм фосфора колеблется в небольших пределах ($0-0,2$ мг/дм 3), определенной тенденции не замечено (рис. 18б).

Таким образом, концентрация общего азота менялась незначительно: падение концентрации органического азота сопровождалось повышением содержания его минеральных форм. Фосфор на протяжении всего эксперимента присутствовал в основном в форме фосфат-иона.

Выводы

В эксперименте по изучению скорости поглощения биогенных веществ численность клеток хлореллы и синезеленых водорослей снижалась, несмотря на то, что концентрация фосфора и азота оставалась на уровне, необходимом для развития водорослей.

Средняя скорость поглощения биогенных элементов клетками хлореллы выше, чем клетками синезеленых водорослей. Скорость поглощения максимальна в период снижения численности клеток в суспензии.

При отмирании клеток хлореллы высвобождается большое количество биогенных веществ (в основном азота), что может спровоцировать развитие синезеленых водорослей в условиях водоема.

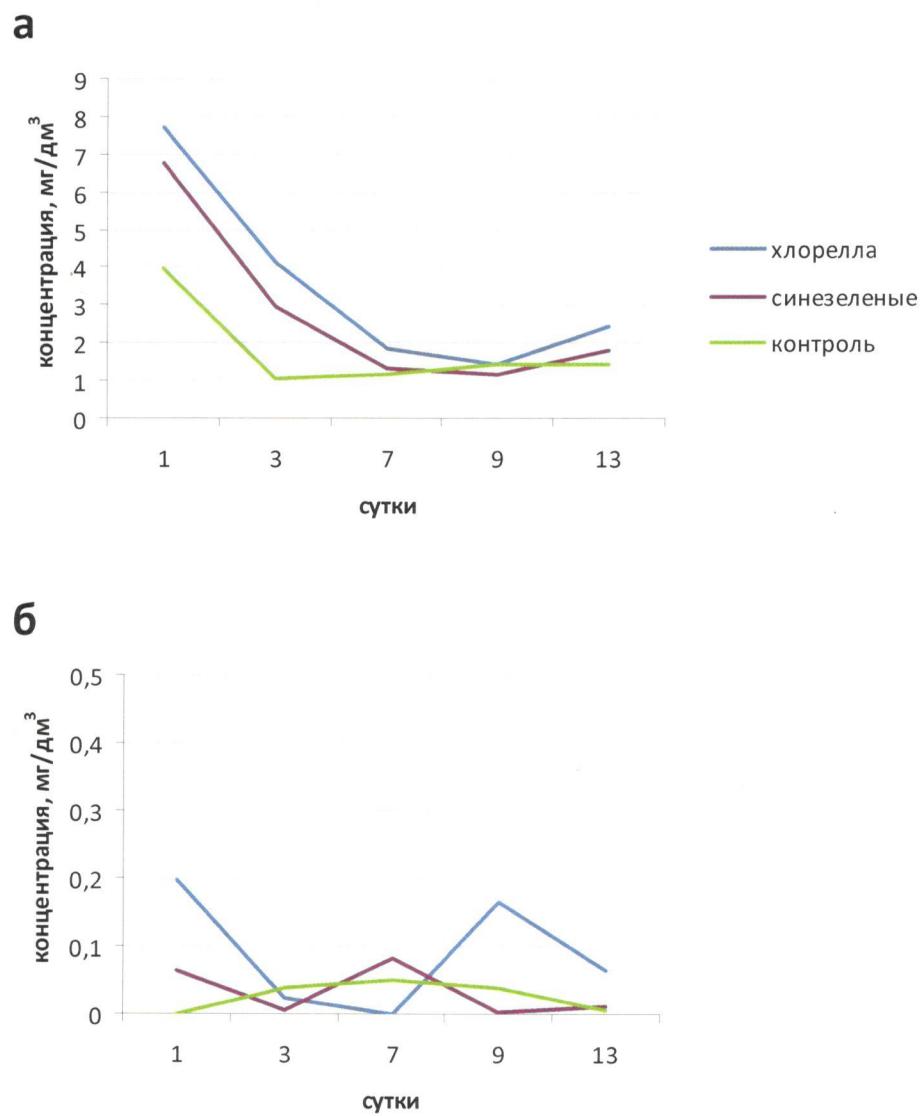


Рис. 18. Изменение концентрации азота органического (а) и фосфора органического (б) в аквариумах с суспензией хлореллы, синезеленых водорослей и контрольном аквариуме.

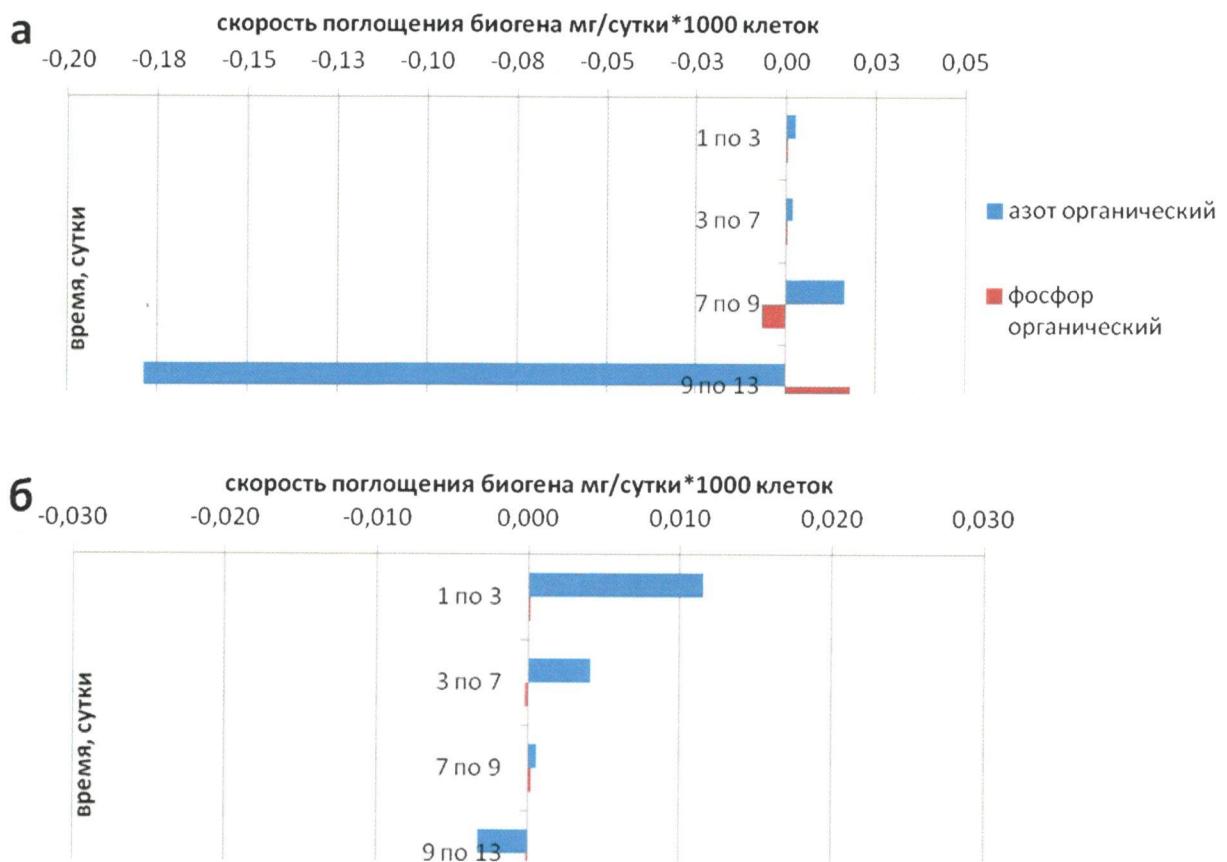


Рис. 19. Скорость поглощения биогенных элементов (органического азота и органического фосфора) клетками хлореллы (а) и синезеленых водорослей (б).

8. ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 НА СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Поглощение ионов растительной клеткой начинается с их взаимодействия с клеточной стенкой. Ионы могут частично локализоваться в межмикеллярных и межфибриллярных промежутках клеточной стенки, частично связываться и фиксироваться в клеточной стенке электрическими зарядами. Поступившие ионы легко вымываются.

Клеточная стенка обладает свойствами ионообменника, так как в ней адсорбированы ионы H^+ и HCO_3^- , обменивающиеся в эквивалентных количествах на ионы внешнего раствора. Из-за преобладания отрицательных фиксированных зарядов в клеточной стенке происходит первичное концентрирование катионов (особенно двух- и трехвалентных). Транспорт ионов через мембрану может быть пассивным и активным (с затратой энергии АТФ). Пройдя через плазмалемму, ионы поступают в цитоплазму, где включаются в метаболизм клетки либо, связываясь с лигандами, переходят в нерастворимые формы.

На способности растительных клеток адсорбировать, поглощать и связывать ионы тяжелых металлов основан метод фиторемедиации, который позволяет обезвреживать токсичные ионы тяжелых металлов с помощью растений.

Среди всех химических загрязнений биосфера тяжелые металлы рассматриваются как имеющие особое экологическое и биологическое значение. Тяжелые металлы, такие как Zn и Cu, необходимы для нормального роста и развития растения, но при избытке в среде они оказывают токсическое действие. Экстремальное повышение содержания этих элементов вызывает повреждение организма.

В литературе приводятся ряды микроэлементов по степени их токсичности для растений. Дуглас П. Ормрод [42] приводит ряд токсичности для ячменя: $Hg > Pb > Cu > Cd > Ni > Zn$. В обзоре Ж. З. Гуральчук [43] приведен следующий ряд: $Cu > Ni > Cd > Zn > Pb > Hg > Fe > Mo > Mn$. Е. А. Гладков [44] предлагает ряд токсичности: $Cu > Ni > Zn > P > Mo > Mn$. Таким образом, медь, по мнению многих авторов, является остротоксичным элементом, в отличие от цинка.

Цель данной работы заключается в исследовании способности *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 влиять на содержание тяжелых металлов в воде.

Задачи:

- Исследовать влияние *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 на содержание меди ($2+$) и цинка ($2+$) в воде;

- Проследить динамику численности *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в водных растворах солей меди (2+) и цинка (2+).

Поглощение меди и цинка растительными клетками исследовалось многими авторами. В работе John E. Bowen [45] показано, что поглощение этих ионов носит активный характер и регулируется метаболически, однако ионы, закрепленные на клеточной стенке, легко вымываются и возвращаются в раствор. В исследовании Nirupama Mallick [46], посвященном влиянию меди на хлореллу (*Chlorella vulgaris*), показано, что эта водоросль выживает при концентрации меди 3 мг/л и даже наблюдается прирост ее биомассы (32%).

Методика исследований

Изучение влияния *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 на содержание меди (2+) и цинка (2+) проводилось в модельном эксперименте в течение 7 дней при естественном освещении. Для введения в раствор ионов меди (2+) и цинка (2+) использовались соли CuSO_4 и ZnSO_4 . Концентрации меди (2+) составили 1 мг/дм³ и 0,1 мг/дм³, концентрация цинка составила 1 мг/дм³. Для создания оптимальных условий растворы готовились на минеральной питательной среде Тамия, разбавленной в 2 раза. Среда Тамия имеет следующий состав: KNO_3 – 5.0 г/дм³; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2.5 г/дм³; KH_2PO_4 – 1.25 г/дм³, сульфат железа или FeSO_4 – 0.003 г/дм³, ЭДТА -0,037 г/дм³.

Исследовались следующие варианты:

- 1) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среде Тамия + медь (2+), концентрация 1 мг/дм³;
- 2) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среде Тамия + цинк (2+), концентрация 1 мг/дм³;
- 3) Среда Тамия + медь (2+), концентрация 1 мг/дм³;
- 4) Среда Тамия + цинк (2+), концентрация 1 мг/дм³;
- 5) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среде Тамия;
- 6) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среде Тамия + медь (2+), концентрация 0,1 мг/дм³;

Все варианты были представлены в трех повторностях.

Исходная численность хлореллы была определена прямым счетным методом, в начальной культуре она составила 57 миллиардов клеток на дм³. В опыте использовалась разбавленная взвесь хлореллы плотностью 1,5 миллиарда клеток на дм³. Изменения численности клеток хлореллы в ходе эксперимента определялась методом измерения оптической плотности (см. раздел 2).

Вывод о влиянии хлореллы на содержание иона металла в среде делали исходя из остаточной концентраций металла растворе, из которого клетки водоросли были удалены в ходе вакуумной фильтрации. Концентрация металла определялась по методике ПНД Ф 14.1:2:4.214-06 на атомно-адсорбционном спектрометре. При измерении концентрации металлов в жидкости данным методом определяются только растворимые формы металлов.

Результаты

В ходе эксперимента было показано, что *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 влияет на содержание меди (2+) и цинка (2+) в водной среде.

В присутствии хлореллы в растворе соли возможны три процесса: биологическое поглощение клеткой (адсорбция ионов на клеточной стенке и транспорт ионов в клетку), связывание ионов тяжелых металлов с клеточными экзометаболитами в нерастворимые комплексы, и химические процессы образования нерастворимых соединений с компонентами среды.

Чтобы исключить влияние химических процессов, изменение концентрации ионов металлов в среде Тамия без добавления *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 было принято за контроль. Исследовалась разность между концентрациями в присутствии хлореллы и концентрациями ионов меди (2+) и цинка (2+) в контроле. Также был произведен расчет количества поглощенного металла суспензией хлореллы за сутки.

Показано, что присутствие *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в начале эксперимента способствует снижению концентрации растворимых форм меди (2+) в растворе (рис. 20). Концентрация меди на 6-е сутки снизилась на 22% по сравнению с исходной концентрацией, но на 7-е сутки концентрация металла возросла и составила 91% от начальной концентрации.

В первые сутки снижение концентрации металла происходит наиболее интенсивно (рис. 21), затем скорость этого процесса снижается, и на 7-е сутки начинается процесс выделения ионов меди обратно в раствор.

Было рассчитано количество атомов меди, связываемых одной клеткой хлореллы в сутки: оно составило $0,03 * 10^9$ атомов меди (2+) в сутки.

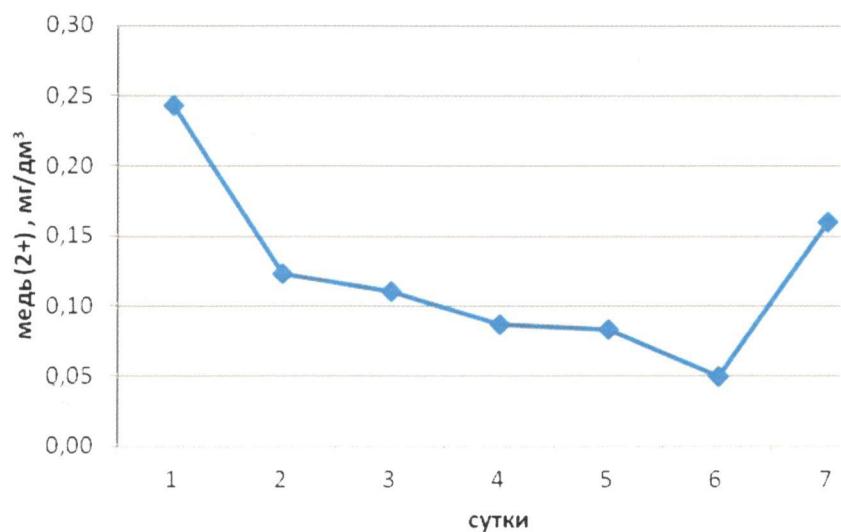


Рис. 20. Изменение разности концентраций меди (2+) в растворе (начальная концентрация 1 мг/дм³) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 и в контроле.

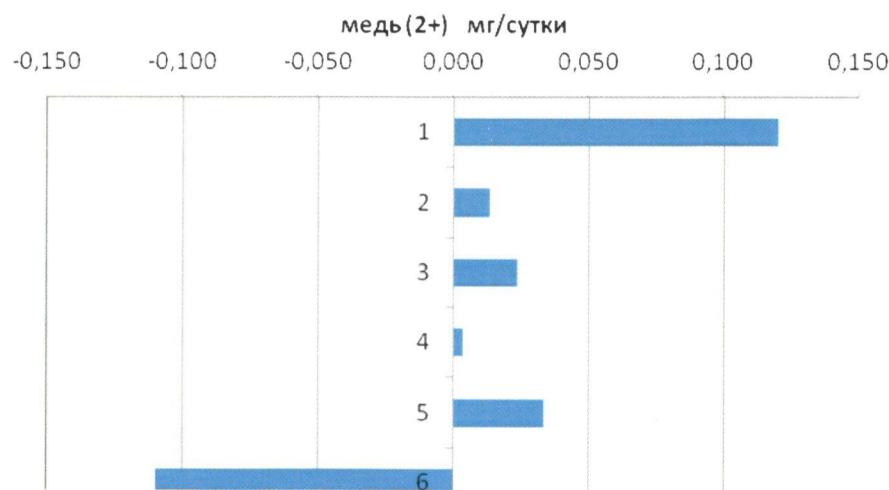


Рис. 21. Скорость изменения концентрации меди (2+) в растворе (начальная концентрация 1 мг/дм³) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111. Положительные значения – процессы снижения концентрации металла, отрицательные значения – выделение металла в раствор.

Результаты эксперимента показали, что присутствие *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 способствует снижению концентрации растворимых форм цинка (2+) в растворе с исходным содержанием 1 мг/дм³ (рис. 22). За первые шесть суток концентрация цинка

(2+) снизилась на 31 % от исходного уровня, но на 7-е сутки его содержание повысилось до 82% от исходного уровня.

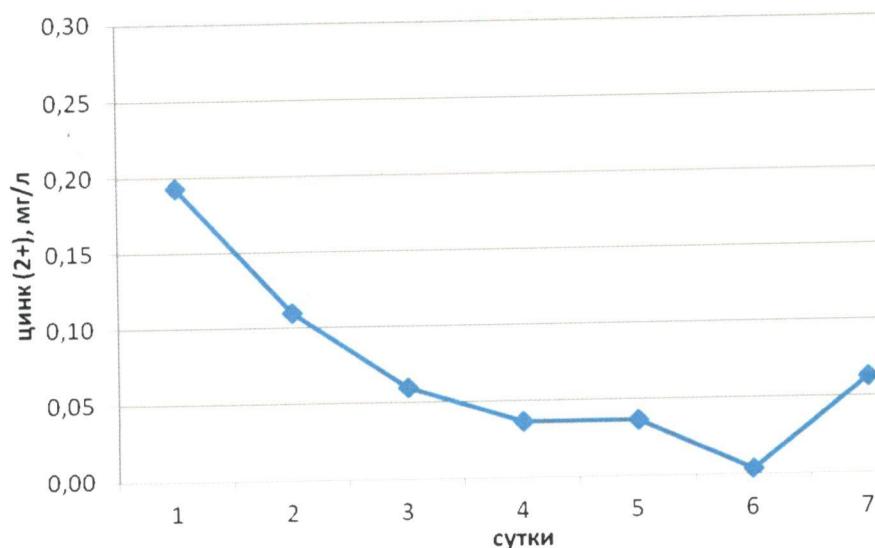


Рис. 22. Изменение разности концентраций цинка (2+) в растворе (начальная концентрация 1 мг/дм³) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 и в контроле.

В первые сутки снижение концентрации металла происходит наиболее интенсивно (рис. 23), затем скорость этого процесса снижается, и на 7-е сутки начинается процесс выделения ионов цинка обратно в раствор.

Количество атомов цинка, связываемых одной клеткой хлореллы в сутки составило $0,06 * 10^9$ атомов.

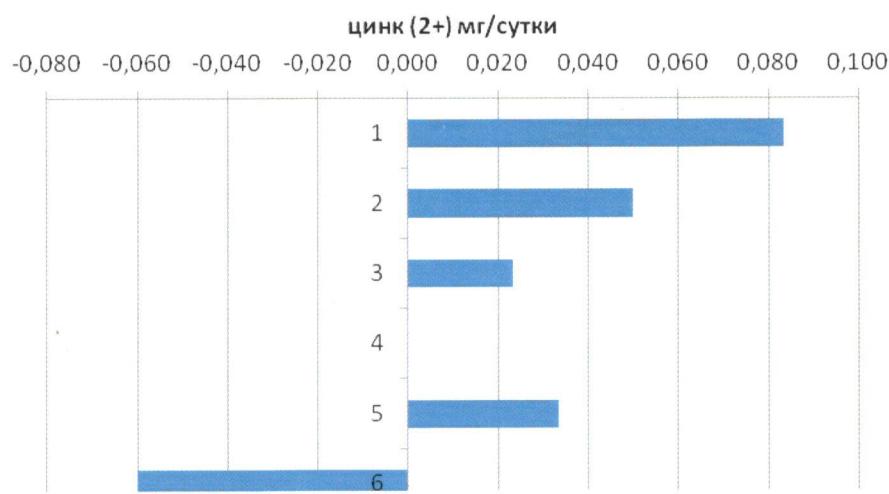


Рис. 23. Скорость изменения концентрации цинка (2+) в растворе (начальная концентрация 1 мг/дм³) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111. Положительные значения – процессы снижения концентрации металла, отрицательные значения – выделение металла в раствор.

Как упоминалось выше, было проведено два варианта эксперимента с разными концентрациями меди. Во втором варианте в среду Тамия была добавлена соль меди (2+) с таким расчетом, чтобы концентрация иона металла в растворе в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 составляла 0,1 мг/дм³ (рис. 24). Фактическая концентрация меди (2+) оказалась выше 0,2 мг/дм³, вследствие того, что фоновая концентрация этого металла в среде Тамия оказалась значительной и достигала 0,1 мг/дм³ (это видно на втором графике на рис. 24).

Результаты эксперимента показали, что в обоих случаях, как и в предыдущих исследованиях, первой фазой процесса является снижение концентрации ионов меди в системах, второй – отдача ионов меди в воду. Причин подобного поведения может быть несколько, однако их конкретизация требует дополнительных исследований, тем более, что количество клеток хлоралы в ходе эксперимента возрастало.

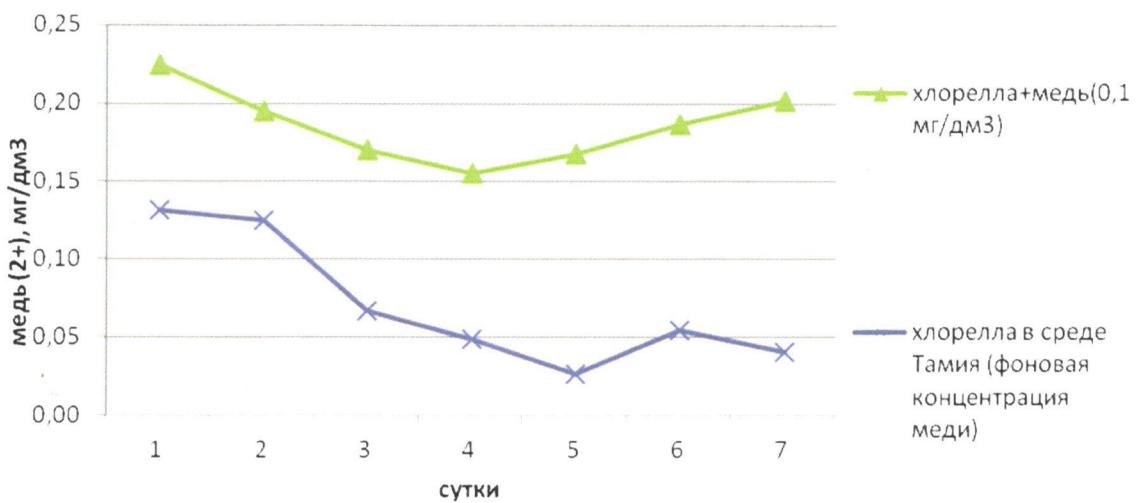


Рис. 24. Изменение концентрации меди (2+) в растворе с добавлением соли металла и в растворе без добавления (среда Тамия) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111.

Фоновое содержание цинка в среде Тамия с *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 также оказалось заметным и составило 0,5 мг/ дм³. Поглощение цинка происходит быстро и эффективно: на 4 сутки концентрация металла составила 14% от исходного содержания, а затем снова начала повышаться (до 45% от исходного содержания на 7 сутки) (рис. 25).

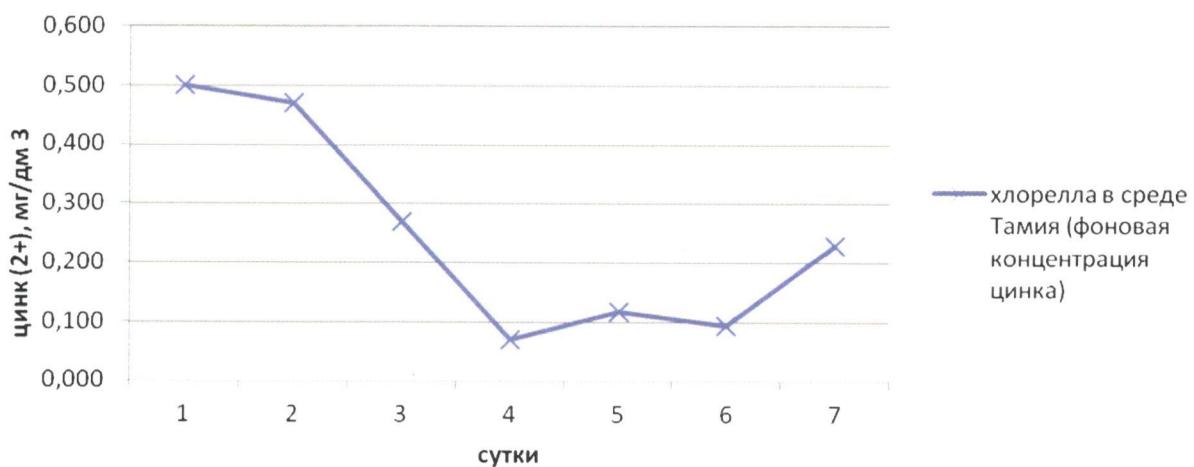


Рис. 25. Изменение концентрации цинка (2+) растворе без добавления металла в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111.

Во всех исследованных вариантах отмечено повышение численности клеток *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 (рис. 26). Максимальной концентрации суспензия хлореллы (3,479 млрд клеток/дм³) достигла в варианте с концентрацией меди (2+) 1 мг/л. Минимальный прирост был характерен для варианта без добавления солей металлов: концентрация хлореллы увеличилась с 1,542 до 2,646 млрд клеток/дм³.