

9. ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 НА СОДЕРЖАНИЕ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Цель данной работы заключается в исследовании способности *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 влиять на содержание нефтепродуктов (НП) в воде.

Задачи:

- Исследовать влияние *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 на содержание нефтепродуктов (дизельное топливо) в воде;

Методика исследований

Изучение влияния *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 на содержание нефтепродуктов в воде проводилось в лабораторном эксперименте в течение 11 дней при естественном освещении. Для получения раствора нефтепродуктов использовалось дизельное топливо. Исходные концентрации нефтепродуктов составили 1,15 мг/дм³ и 0,5 мг/дм³. Для эксперимента использовалась кипяченая водопроводная вода, сбалансированная по минеральному составу. Пробы на анализ отбирались на 1, 2, 3, 5, 9, 10 и 11 сутки.

Исследовались следующие комбинации культуры хлореллы и нефтепродуктов:

- 1) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в воде + дизельное топливо, концентрация 1,15 мг/дм³;
- 2) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в воде + дизельное топливо, концентрация 0,5 мг/дм³;
- 3) Вода + дизельное топливо, концентрация 1,15 мг/дм³;
- 4) Вода + дизельное топливо, концентрация 0,5 мг/дм³;
- 5) *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в воде;

Все варианты были представлены в трех повторностях.

Численность хлореллы в исходной культуре составила 118 миллиардов клеток на дм³. В опыте использовалась разбавленная взвесь хлореллы плотностью 1,18 миллиарда клеток на дм³.

Вывод о влиянии хлореллы на содержание нефтепродуктов в среде делали исходя из остаточной концентраций нефтепродуктов в растворе. Измерение концентрации нефтепродуктов производили на приборе ФЛЮОРАТ 02М.

Результаты

В ходе эксперимента было показано, что *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в условиях проведенного эксперимента не влияет на содержание нефтепродуктов в водной среде.

В водной среде возможны следующие процессы, влияющие на концентрацию нефтепродуктов: абсорбция нефтепродуктов на клеточной стенке хлореллы; абсорбция нефтепродуктов на стенках сосуда; разложение нефтепродуктов под действием нефтеокисляющих бактерий; разложение нефтепродуктов под действием солнечного света и кислорода. Водоросль хлорелла не способна метаболизировать углеводороды нефтепродуктов [4, 47, 48].

Показано, что присутствие *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 не способствует значительному снижению концентрации нефтепродуктов в водной среде. Данная закономерность прослеживается как при концентрации нефтепродуктов 1,15 мг/дм³ (рис. 27), так и при концентрации 0,5 мг/дм³ (рис. 28). Вероятно, снижение концентрации нефтепродуктов во всех вариантах обусловлено химическими и физическими процессами.

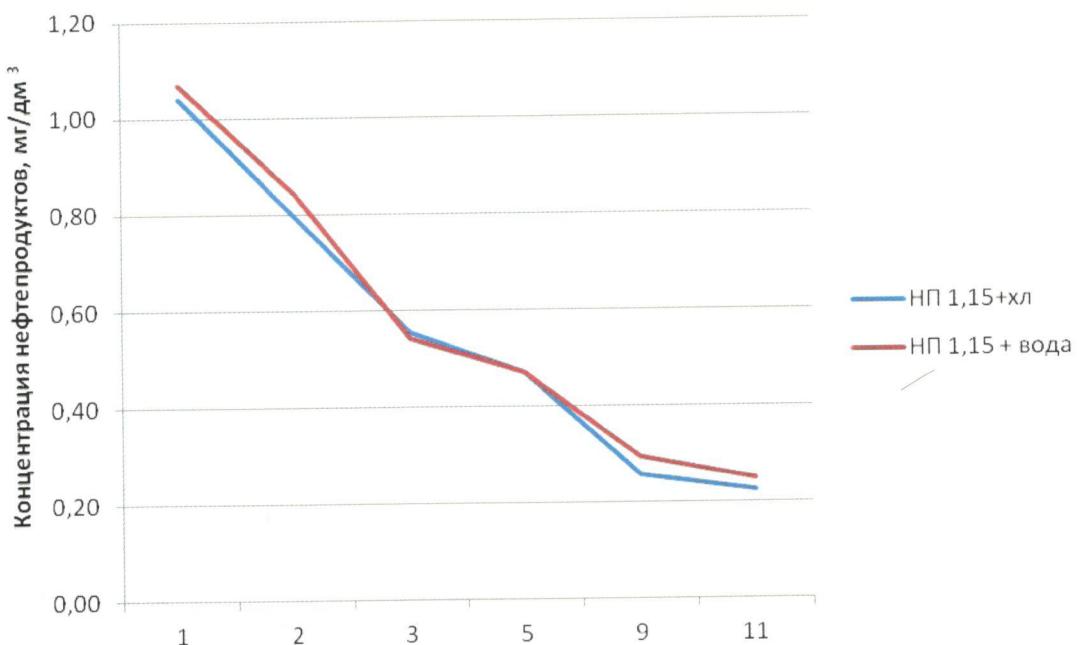


Рис. 27. Изменение концентрации нефтепродуктов (НП) в водной среде (начальная концентрация 1,15 мг/дм³) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 и без введения *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среду.

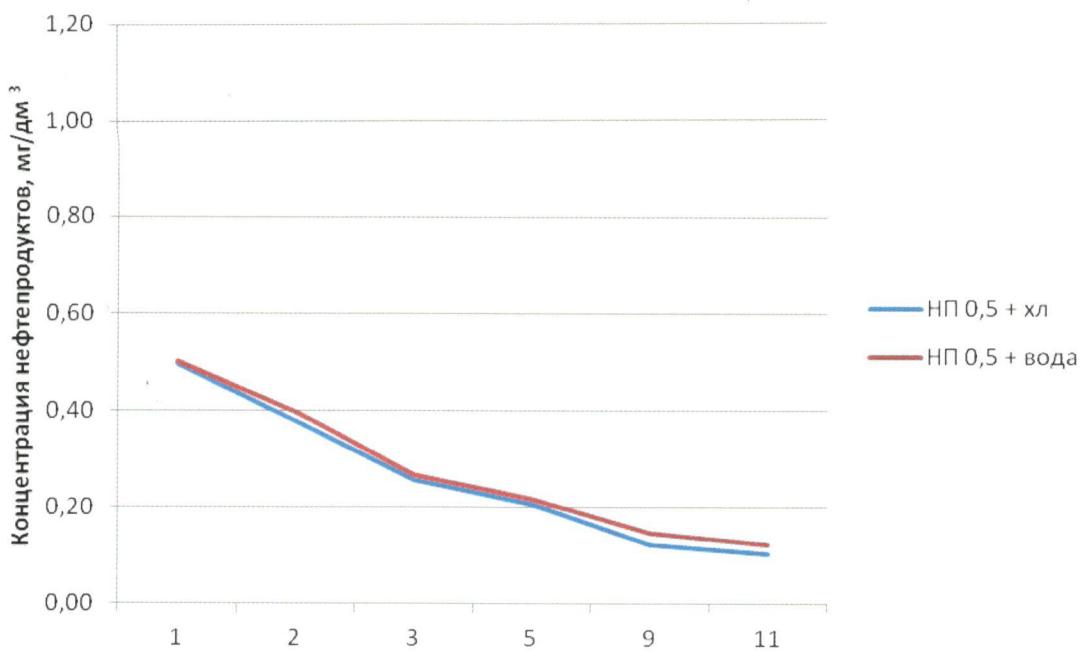


Рис. 28. Изменение концентрации нефтепродуктов (НП) в водной среде (начальная концентрация 0,5 мг/дм³) в присутствии *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 и без введения *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среду.

Отмечено повышение численности клеток *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 во всех исследованных вариантах (рис. 29). Наибольший рост оптической плотности суспензии хлореллы прослеживался в вариантах с нефтепродуктами.

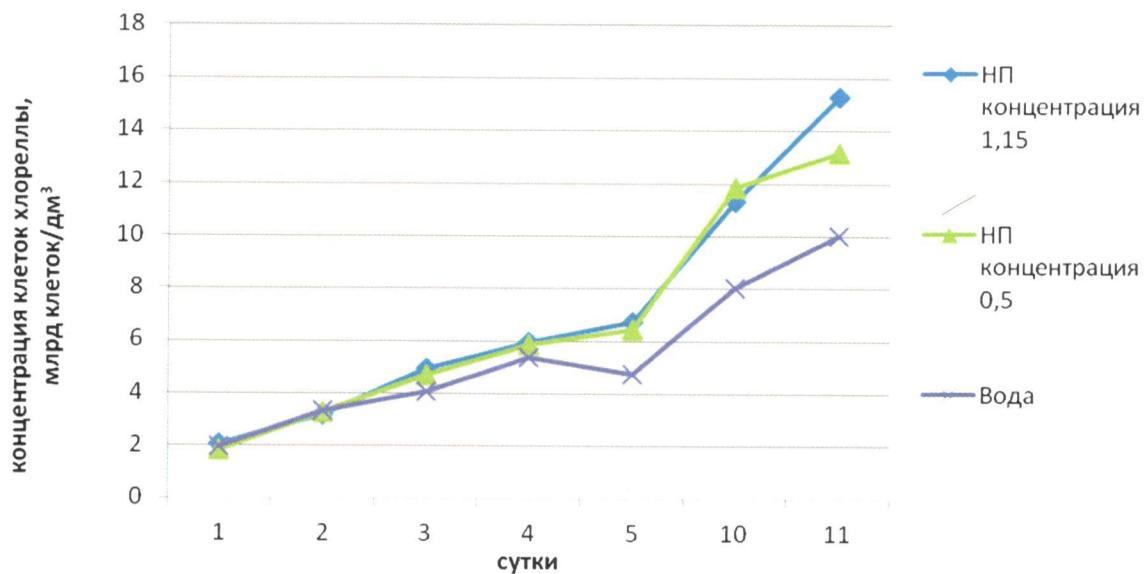


Рис. 29. Изменение численности клеток *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в среде с различным содержанием нефтепродуктов (1,15 и 0,5 мг/дм³), а также в воде без добавления нефтепродуктов.

Выводы:

Chlorella vulgaris ИФР № С 111 не влияет на концентрацию нефтепродуктов в водной среде. Снижение концентрации нефтепродуктов, скорее всего, обусловлено химическими и физическими процессами.

Наблюдается рост численности клеток *Chlorella vulgaris* ИФР № С 111 в растворе нефтепродуктов, что указывает на стимулирующий эффект умеренных концентраций нефтепродуктов в воде на развитие хлореллы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что между культурой штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111 и синезелеными водорослями возможны более или менее антагонистические взаимодействия. В более редких случаях культура хлореллы способна оказывать на некоторые виды не ингибирующее, а стимулирующее действие.

Хлорелла способна успешно конкурировать с синезелеными водорослями, при условии, что плотность ее клеток сравнима с плотностью последних (или даже превосходит), а условия среды подходят для ее развития. В этих условиях хлорелла активно размножается, поглощает биогенные элементы и подавляет развитие не только синезеленых, но и зеленых водорослей. Культура хлореллы в активном состоянии способна снижать концентрацию тяжелых металлов, таких как медь (2+) и цинк (2+).

Культура хлореллы в небольших концентрациях не оказывает желаемого эффекта, возможно, в силу того, что не выделяет сильных ингибиторов и токсинов. Вещества, выделяемые хлореллой, могут стимулировать развитие других групп водорослей (например, зеленых хлорококковых), меняя структуру альгоценоза.

При достижении культурой хлореллы высокой концентрации ее масса должна изыматься из водоема тем или иным путем, так как может служить мощным источником вторичного загрязнения, в частности, биогенными веществами (в основном соединениями азота), что может спровоцировать развитие синезеленых водорослей в условиях водоема.

Хороший эффект может дать сочетание двух факторов, например, добавление суспензии хлореллы и аэрация воды, что позволило бы аммонийным формам азота перейти в нитратные, более благоприятные для зеленых водорослей.

В качестве рекомендации можно предложить ООО НПО «Альгобиотехнология» проанализировать выращиваемые культуры хлореллы на содержание альговирусов во избежание непрогнозируемых трансформаций альгоценозов водоемов, обрабатываемых суспензией хлореллы.

Что касается проверки достоверности высказанных выше гипотез относительно механизмов взаимодействия хлореллы и синезеленых водорослей, можно сделать следующие заключения:

- Гипотеза 1 - Штамм *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 в процессе своей жизнедеятельности подавляет развитие синезеленых водорослей. Серия экспериментов показала, что синезеленые водоросли по-разному реагируют на присутствие культуры штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С – 111. Среди изученных культур синезеленых водорослей наиболее отрицательное влияние хлорелла оказала на культуры: № 657

(*Oscillatoria* af. *splendida*), 729 (*Oscillatoria* sp.), 799 (*Anabaena spiroides*), 1414 (*Oscillatoria* sp.). Перечисленные культуры синезеленых погибали. 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. *Гипотеза подтверждена для отдельных видов синезеленых водорослей.*

- **Гипотеза 2 - *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 выделяет в процессе жизнедеятельности экзометаболиты, подавляющие развитие синезеленых водорослей.** Серия тестов продемонстрировала, 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). *Гипотеза подтверждена для высокой плотности культуры хлореллы (~ 14 млн кл/мл) при взаимодействии с естественным сообществом синезеленых водорослей. Гипотеза не подтверждена для низкой плотности хлореллы (~ 2,8 млн кл/мл). Гипотеза не подтверждена для экзометаболитов культуральной жидкости хлореллы при отсутствии клеток самой водоросли.*
- **Гипотеза 3 - *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 конкурирует с синезелеными водорослями путем более активного поглощения биогенных элементов из воды, лимитируя развитие синезеленых водорослей.** Серия экспериментов продемонстрировала, что средняя скорость поглощения биогенных элементов клетками хлореллы достоверно 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. *Гипотеза подтверждена в отношении скорости поглощения биогенных веществ.*

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Сиренко Л. А., Гавриленко М. Я. «Цветение» воды и эвтрофирование. – Киев: Наук. думка, 1978. – 232 с. 5. Богданов Н. И. Биологическая реабилитация водоемов. 3 изд., доп. и перераб. – Пенза: РИО ПГСХА, 2008. – 152 с.
2. Андреюк Е. И., Коптева Ж. П., Занина В. В. Цианобактерии. – Киев: Наук. Думка, 1990. – 200 с.
3. Эвтрофирование малых водохранилищ / Локоть Л.И., Горлачев В.П., Горлачева Е.П. и др. – Новосибирск, Наука, 1985. – 160 с.
4. Водоросли. Справочник / Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П. и др. – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.
5. Богданов Н. И. Биологическая реабилитация водоёмов / 3 изд., доп. и перераб. – Пенза: РИО ПГСХА, 2008. – 126 с.
6. Брильков А. В. Анализ динамической и популяционной устойчивости непрерывных культур микроорганизмов при ограничении их роста. Дисс. на соискание уч. ст. канд. физико-математических наук. – Красноярск, 1987. – 169 с.
7. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
8. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А. И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко и др.; Под ред. А. И. Нетруса. — М.: Издательский центр «Академия», 2004. - 272 с.
9. Лукас С. Экологическое значение метаболитов, выделяемых во внешнюю среду // Механизмы биологической конкуренции. М.: Мир, 1964. – С. 242 – 262.
10. Сиренко Л. А., Козицкая В. Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. – Киев: Наук. думка, 1988. – 256 с.
11. Набивайло Ю. В., Титлянов Э. А. Конкурентные взаимоотношения водорослей в природе и культуре. // Биология моря, 2006, том 32, № 5, с. 315–325.
12. Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. Особи, популяции и сообщества. Т. 1. М.: Мир, 1989. – 667 с.
13. Williams F. M. Dynamics of microbial population // System analysis and simulation in ecology. / Ed. B. C. Patteu. Vol. 1. – New York and London: Academic Press, 1971. – Р. 197 – 267.
14. Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Экология водных микроорганизмов. – М.: Наука, 1977. 289 с.
15. Сиренко Л. А. Физиологические основы размножения синезеленых водорослей в водохранилищах. – Киев: Наук. думка, 1972. – 204 с.

16. Успенская В. И. Экология и физиология питания пресноводных водорослей. – М.: Изд-во Московского университета, 1966. – 118 с.
17. Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М. С. Гиляров. – М.: Сов. энциклопедия, 1986. – 831 с.
18. Саут Р., Уиттик А. Основы альгологии. М.: Мир, 1990. – 597 с.
19. Малиновский В. И. Физиология растений: Учебное пособие. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2004. – 106 с.
20. Гусев М.В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
21. Сакевич А. И. Экзометаболиты пресноводных водорослей. – Киев: Наук. думка, 1985. – 200 с.
22. Царенко В.М. Особенности внеклеточного накопления органических кислот у некоторых видов водорослей // Гидробиологический журнал, 1984, том XX, № 1. С. 88 – 92.
23. Козицкая В.Н. Ингибирующие вещества, продуцируемые некоторыми Cyanophyta // Гидробиологический журнал, 1984, том XX, № 2. С. 51 – 55.
24. Greengard Harry, Grossman M. I., Woollet J. R., Ivy A. C. Chlorellin, an antibacterial substance from Chlorella. // Science, April 28, 1944.
25. Горюнова С.В., Демина Н.С. Водоросли-продуценты токсических веществ. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
26. Арендарчук В. В. Влияние β-индолилуксусной кислоты на некоторые синезеленые водоросли// Гидробиологический журнал, 1974, т.Х, № 5. С. 64 – 69.
27. Бульон В.В. Внеклеточная продукция фитопланктона // Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л, 1983. – С. 68 – 82.
28. Андреева В. М. Род Chlorella. Морфология, систематика, принципы классификации – Л.: Изд-во «Наука», Ленингр. отд., 1975. – 110 с.
29. Богданов Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных. Пенза, 2007. – 48 с.
30. Культивирование и применение микроводорослей в народном хозяйстве. Материалы республиканского совещания, Ташкент 5 – 7 октября 1977 г. – Ташкент: Фан, 1977. 134 с.
31. Музрафов А. М., Таубаев Т. Т. Культивирование и применение микроводорослей. – Ташкент: Фан, 1984. – 132 с.

32. Макарова Е. И., Отурина И. П., Сидякин А. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей-обитателей водных экосистем. // Экосистемы, их оптимизация и охрана, 2009. Вып. 20. С. 120 – 133.
33. Вебер К., Вотапек В., Ливанский К., Заградник Я., Прокеш Б. Рост Chlorella vulgaris на сточных водах // Гидробиологический журнал, 1984, том XX, № 1. С. 32 – 41.
34. Мельников С. С., Мананкина Е. Е. Хлорелла: Физиологически активные вещества и их использование. - Минск: Навука и тэхніка, 1991. – 79 с.
35. Патент РФ № 1751981. Штамм микроводоросли Chlorella vulgaris – продуцент биомассы.
36. Патент РФ № 2176667. Способ культивирования микроводорослей на основе штамма Chlorella vulgaris № С – 111.
37. Патент РФ № 2263141. Способ борьбы с «цветением» водоемов синезелеными водорослями.
38. Косинова И. И., Валяльщиков А. А. Об эффективности применения биологических методов для оптимизации эколого-гидрохимического состояния Матырского водохранилища // Вестник ВГУ, серия: Геология, 2010, № 2, июль – декабрь. С. 286 – 290.
39. Абакумов В. А. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. – Л.: Гидрометеоиздат, 1983. – 240 с.
40. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1973. – 592 с.
41. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М: «Высшая школа», 1990. – 350 с.
42. Дуглас П. Ормрод. Воздействие загрязнения микроэлементами на растение. С. 327-351. Микроэлементы и устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды. - Минск: Наука и техника , 1983.-192с.
43. Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам. Физиология и биохимия культурных растений.- 1994.- Т 26, №2.- с. 107-117.
44. Гладков Е. А. Влияние токсикантов на озеленение населенных пунктов и городов. Экология и промышленность . - 2006. - № 8. - С. 42-43
45. Bowen John E. Absorption of Copper, Zinc, and Manganese by Sugarcane Leaf Tissue. Plant Physiol. 1969. № 44, p. 255-261.
46. Mallick Nirupama. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga Chlorella vulgaris: response of the antioxidant system. J. Plant Physiol. 2004 №161. P. 591–597.

47. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology / by Laura Barsanti and Paolo Gualtieri. CRC Press, 2006. – 300 p.

48. Эролова Х.Т., Абдукадиров А.А. К вопросу использования микроводорослей и водных макрофитов в биологической очистке промышленных сточных вод. // Доклады АН РУз. № 4 -Т.2002. с. 48-50.

Приложение А
 Российской Федерации
 ФГУП РосНИИВХ, г. Екатеринбург, ул. Мира 23
 Аккредитованная Лаборатория аналитического контроля вод
 Тел. 8(343) 374-80-92
 E-mail: lakvniivh@ovi.com
Аттестат аккредитации
№ РОСС RU. 0001. 513459

ПРОТОКОЛ №

качественной идентификации органических соединений пробы воды

Дата и место отбора проб	24.10.2011 г., г. Екатеринбург,
Регистрационный номер / шифр заказчика	479 / 1 Культуральная жидкость Chlorella 480 / 2 Гомогенизированная Chlorella 481 / 3 Культуральная жидкость цианобактерий 482 / 4 Гомогенизованные цианобактерии
Дата и время приемки проб	24.10.2011 г. 16 ч. 00 мин.
Дата выдачи протокола	21.11.2011 г.

Результаты анализа

Проба 479 (1 – Культуральная жидкость Chlorella)

Пробоподготовка 1:

К 350 см³ пробы добавили 60 г NaCl, довели pH до 9-10 (по индикаторной бумаге) раствором NaOH и провели экстракцию 20 см³ хлористого метилена в течение 10 мин. Экстракт слили. Затем довели pH раствора до 2-3 концентрированной серной кислотой и провели экстракцию 20 см³ хлористого метилена из кислой среды. Экстракты из щелочной и кислой среды объединили, пропустили через слой обезвоженного Na₂SO₄ для осушки и упарили до 1 см³ на ротационном испарителе.

Экстракт анализировали на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой EC-1 15м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис. 1-2 и в таблице 1.

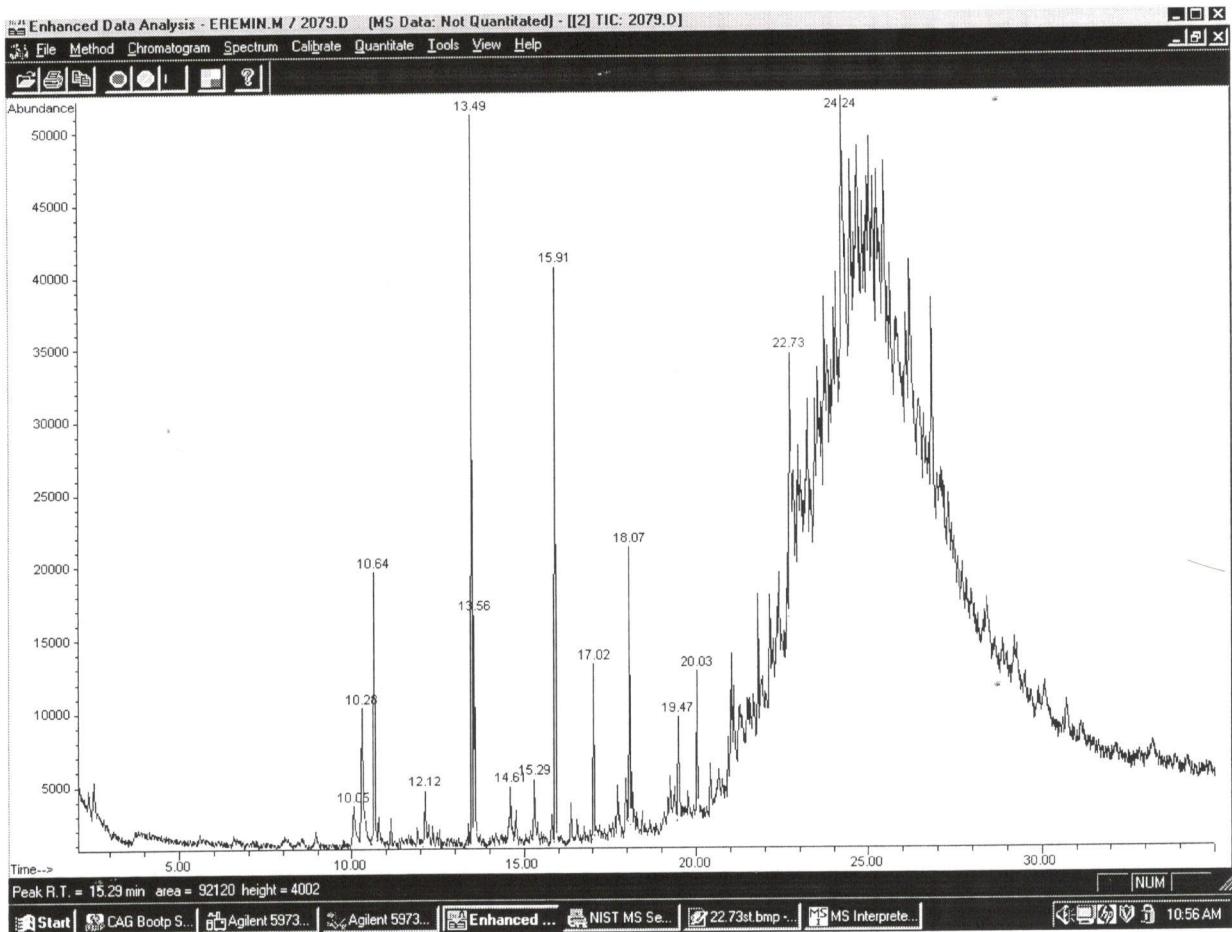


Рис. 1 Хроматограмма экстракта из культуральной жидкости Chlorella. Экстрагент – хлористый метилен.

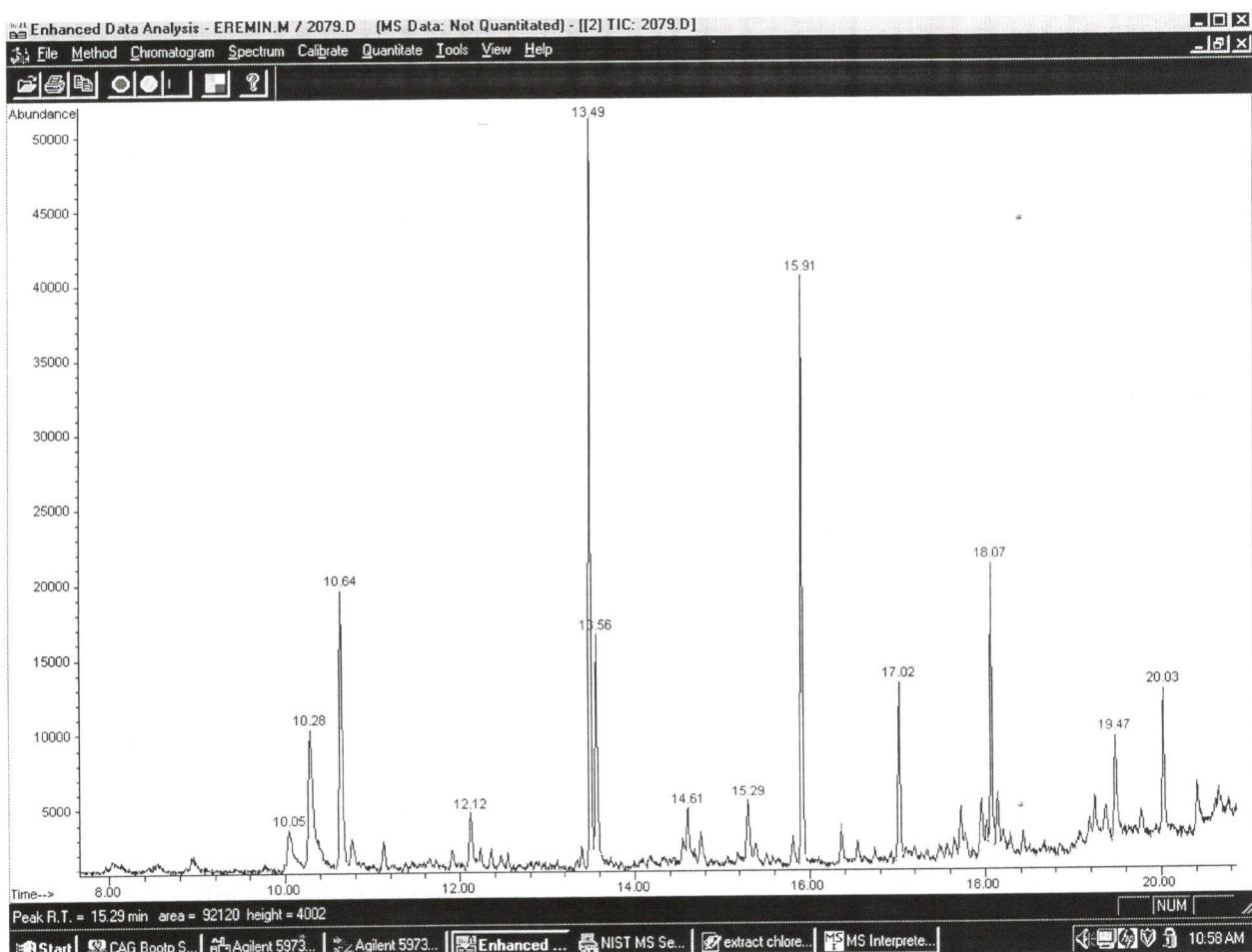
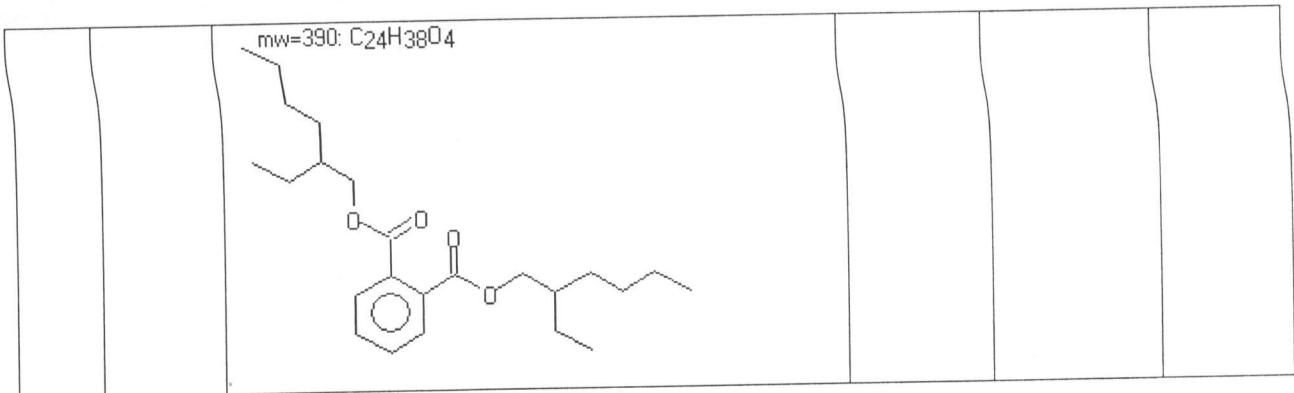


Рис. 2 Хроматограмма экстракта из культуральной жидкости Chlorella. Экстрагент – хлористый метилен. Увеличенный масштаб.

Таблица 1 – Идентификация веществ, обнаруженных в экстракте культуральной жидкости Chlorella

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	10.05	4-метилморфоролин	123000	3,7	46
2	10.28	бензтиазол	223000	6,7	98
3	10.64	додекан	395000	11,9	95
4	12.12	не идентифицируется	85000	2,6	
5	13.49	тетрадекан	707000	21,2	95
6	13.56	2-Oxazolidinone	241000	7,2	38
7	14.60	2,5 – ди(1,1 – диметилэтил)фенол	52000	1,6	91
8	15.29	Диэтилфталат	80000	2,4	72
9	15.91	Гексадекан	567000	17,0	95
10	17.02	Гептадекан	156000	4,7	91
11	18.07	Октацадекан	261000	7,8	93
12	19.47	Гексадекановая кислота	97500	2,9	94
13	20.03	Эйкозан C ₂₀ H ₄₂	130000	3,9	94
14	22.73	9 – октацаденамид	91000	2,7	62
15	24.24	Ди(2-этилгексил)фталат	122000	3,7	80



Пробоподготовка 2:

Пробоподготовка не проводилась.

Проба анализировалась на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой ZB-WAX 30м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис. 3-5 и в таблице 2.

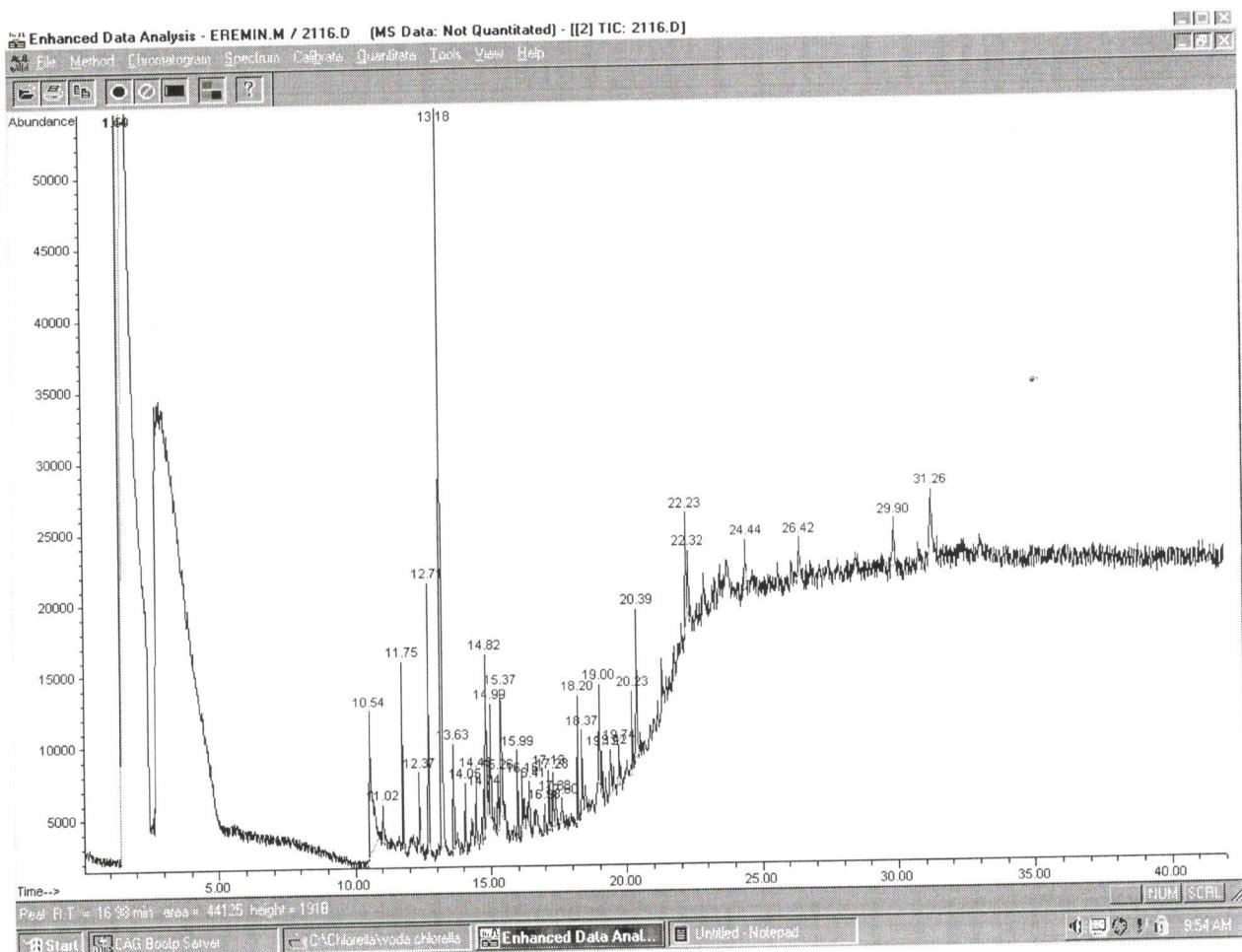


Рис. 3 Хроматограмма культуральной жидкости Chlorella.

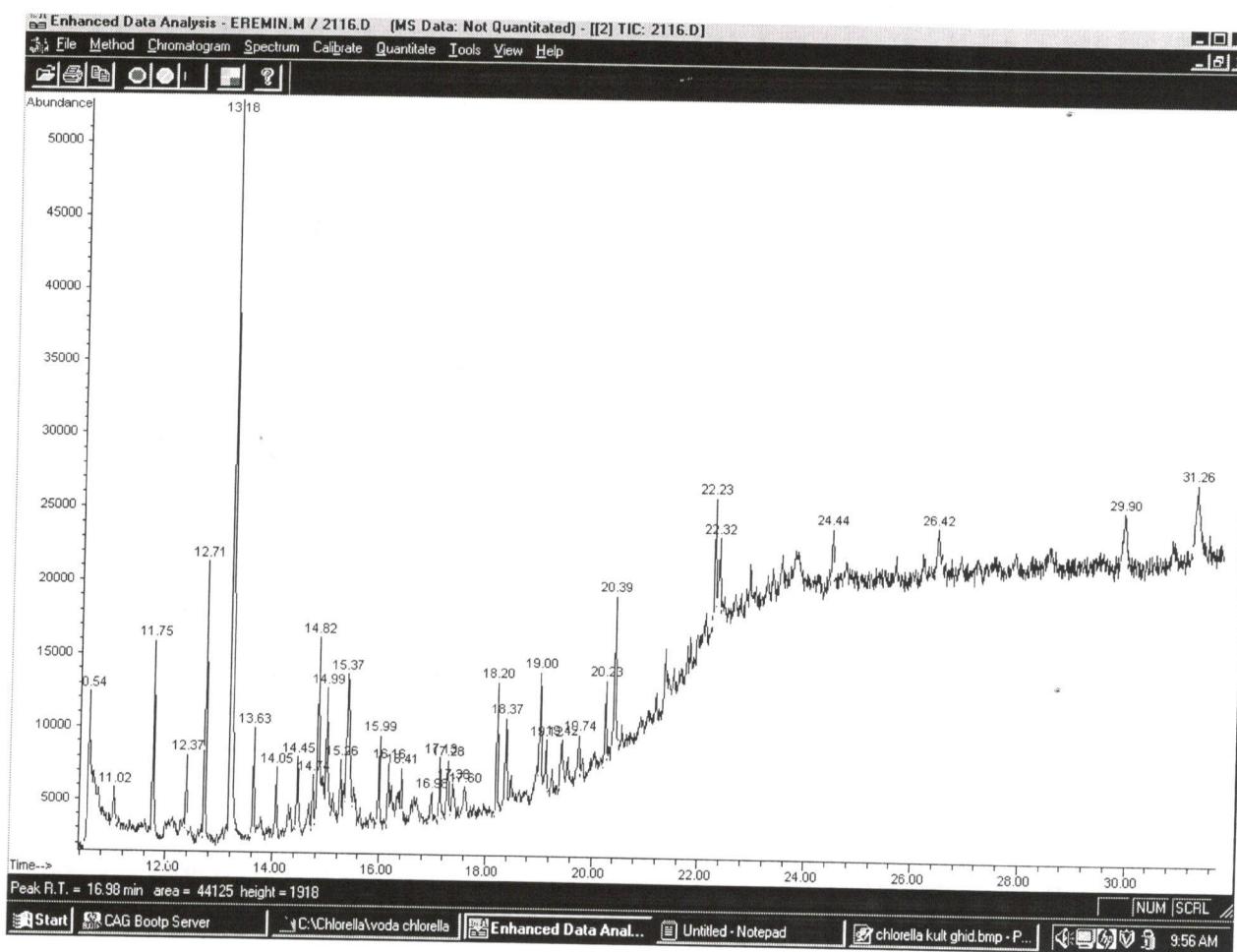


Рис. 4 Хроматограмма культивированной жидкости Chlorella. Увеличенный масштаб.

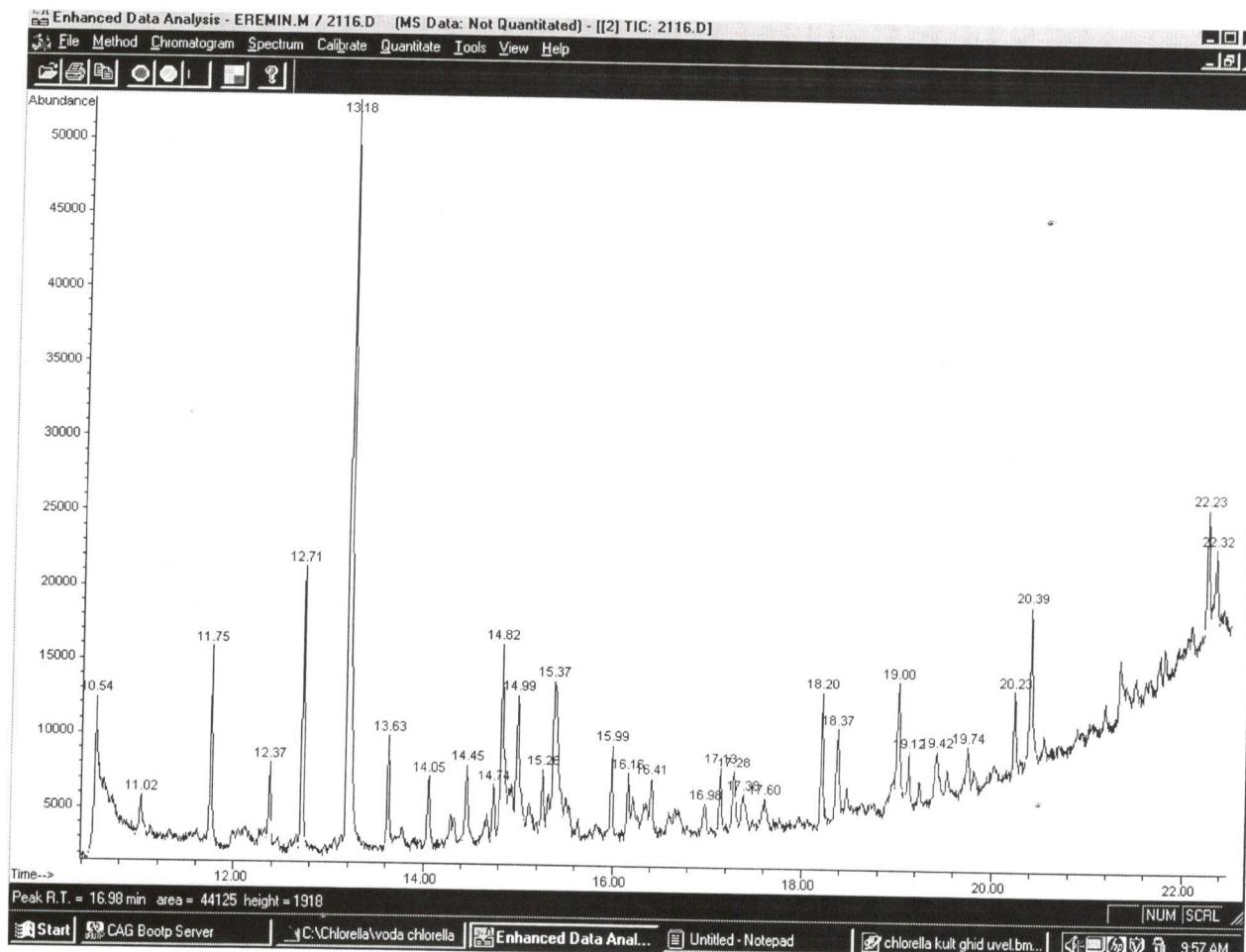
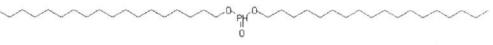


Рис. 5 Хроматограмма культивированной жидкости Chlorella. Увеличенный масштаб.

Т а б л и ц а 2 – Идентификация веществ, обнаруженных в культуральной жидкости Chlorella

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	10.538	Не идентифицируется	611011	10.681	
2	11.024	Не идентифицируется	60991	1.066	
3	11.750	1-гидроксипропанон-2	196222	3.430	9
4	12.374	Гептанол-1	63278	1.106	64
5	12.715	2-этилгексанол-1	274286	4.795	72
6	13.179	Уксусная кислота	1184030	20.697	83
7	13.624	Октанол-1	106926	1.869	90
8	14.053	Пропановая кислота	92125	1.610	94
9	14.454	Нонанол-2	103042	1.801	40
10	14.738	Не идентифицируется	60087	1.050	
11	14.820	Нонанол	215372	3.765	90
12	14.987	Бутановая кислота	181199	3.167	45
13	15.255	2-гидроксибензальдегид	60029	1.049	95
14	15.366	2-пропеновая кислота	320534	5.603	75
15	15.988	Декен-1	80692	1.411	87
16	16.158	Пентановая кислота	54627	0.955	72
17	16.414	Ацетамид	54926	0.960	72
18	16.978	Не идентифицируется	44125	0.771	
19	17.133	Додеканол-1	69780	1.220	83
20	17.275	Гептановая кислота	87154	1.523	78
21	17.376	Гексановая кислота	62032	1.084	53
22	17.603	no identification	52719	0.922	
23	18.203	Циклододекан	135566	2.370	96
24	18.370	Не идентифицируется	134960	2.359	
25	19.004	Фенол	143436	2.507	91
26	19.121	Не идентифицируется	52653	0.920	
27	19.414	Не идентифицируется	95868	1.676	
28	19.740	2-метилфенол	56932	0.995	50
29	20.225	Phosphonic acid, dioctadecyl ester 	87510	1.530	74
30	20.390	Циклододекан	213546	3.733	91
31	22.232	Гексадеканол-1	123353	2.156	90
32	22.324	Диэтилфталат	81494	1.425	90
33	24.444	Не идентифицируется	74336	1.299	
34	26.417	Тетрадекановая кислота	99737	1.743	89

35	29.897	Не идентифицируется	133572	2.335		
36	31.261	Гексадекановая кислота	252613	4.416	58	

Проба 480 (2 – Гомогенизированная Chlorella)

Пробоподготовка 1:

Клетки Chlorella предварительно осажденные на центрифуге, но не высушенные растерли в ступке с толченым стеклом. Затем к полученной массе добавили хлористый метилен (объем массы клеток: объем $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1 : 1$) и эктрагировали в течение 10 мин. Далее полученную смесь расслоили на центрифуге и экстракт проанализировали на хроматографе.

Экстракт анализировался на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой EC-1 15м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис 6-7 и в таблице 3.

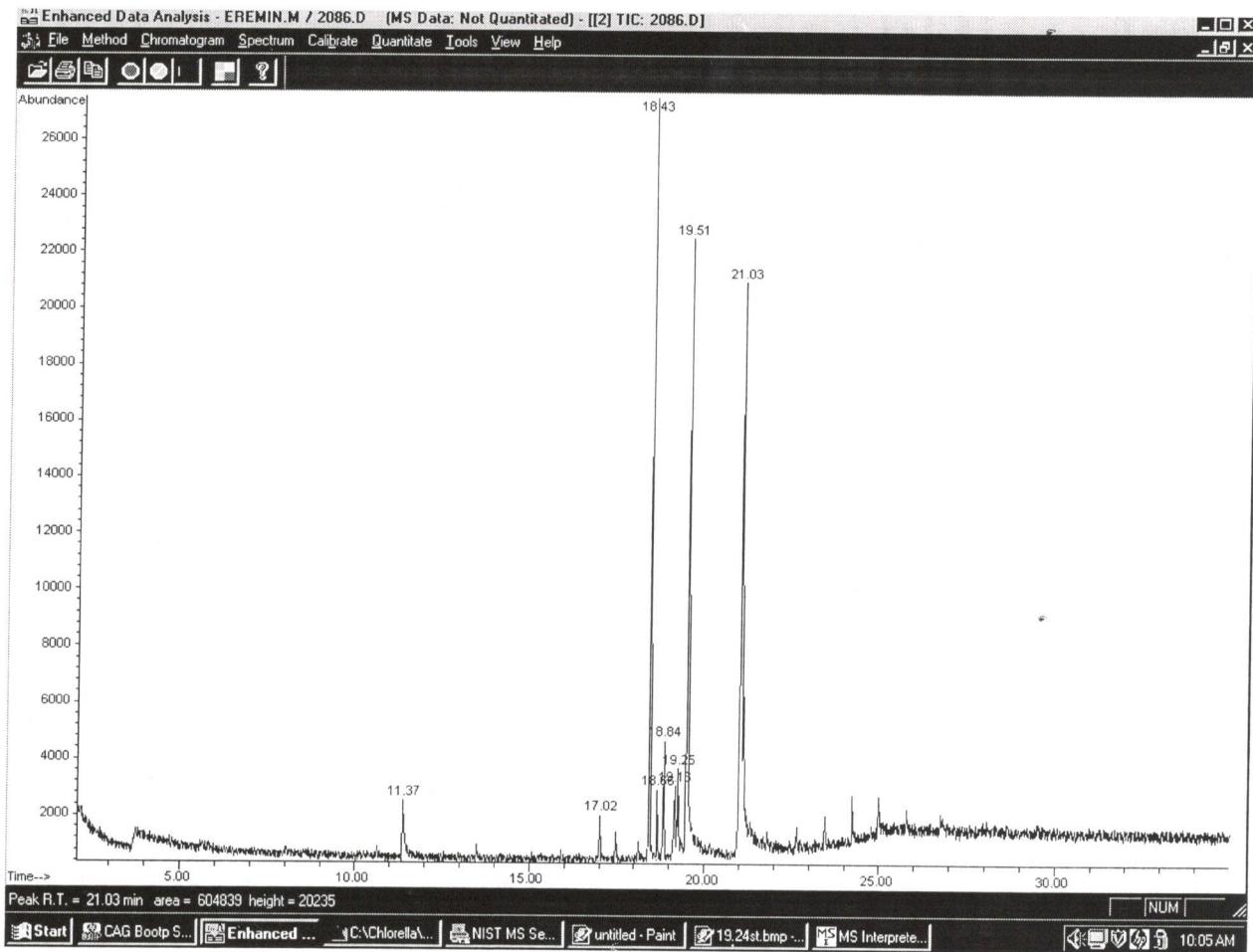


Рис. 6 Хроматограмма экстракта гомогенизированной Chlorella. Экстрагент – хлористый метилен.

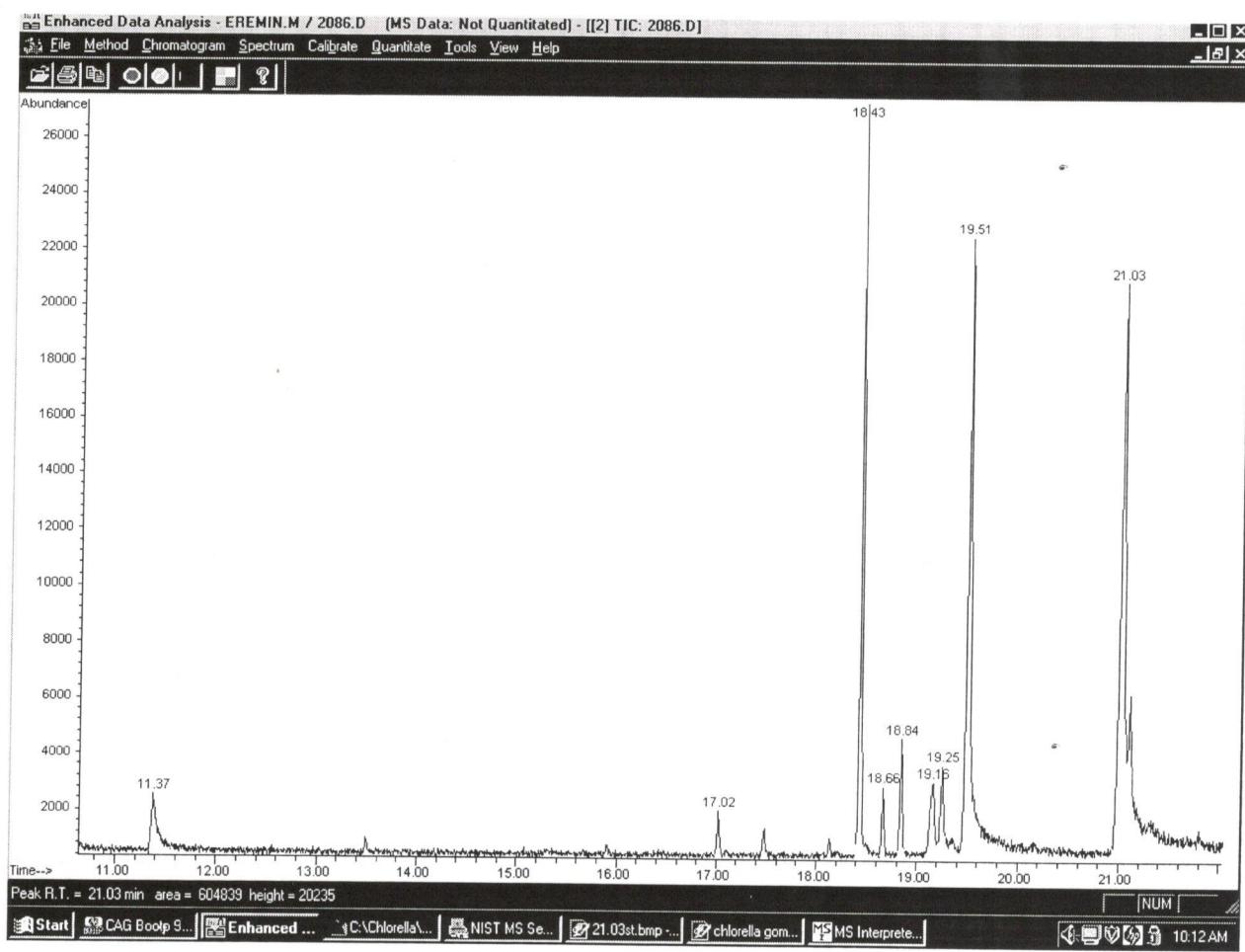
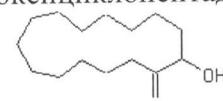


Рис. 7 Хроматограмма экстракта гомогенизированной Chlorella. Экстрагент – хлористый метилен. Увеличенный масштаб.

Т а б л и ц а 3 – Идентификация веществ, обнаруженных в экстракте гомогенизированной Chlorella

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	11.37	Индол 	59000	2,9	91
2	17.02	nonадекан	17000	0,8	78
3	18.43	Bicyclo(3.1.1)heptane,2,6,6 – trimethyl-, [1R(1alpha, 2beta, 5alpha)] 	359000	17,6	50

4	18.66	не идентифицируется	36000	1,8	64
5	18.84	E-6-Octadecen-1-d acetate 	274286	13,4	72
6	19.16	не идентифицируется	74000	3,6	
7	19.25	2-гидроксицикlopентадеканон 	62000	3,0	59
8	19.51	Гексадекановая кислота	548000	26,8	95
9	21.03	9,12,15 – октадекатриен-1-ол 	612000	30,0	91

Пробоподготовка 2:

Клетки Chlorella предварительно осажденные на центрифуге но не высушенные растерли в ступке с толченым стеклом. Далее полученную смесь расслоили на центрифуге и водный раствор над осадком проанализировали на хроматографе.

Проба анализировалась на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой ZB-WAX 30м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис 8-10 и таблице 4.

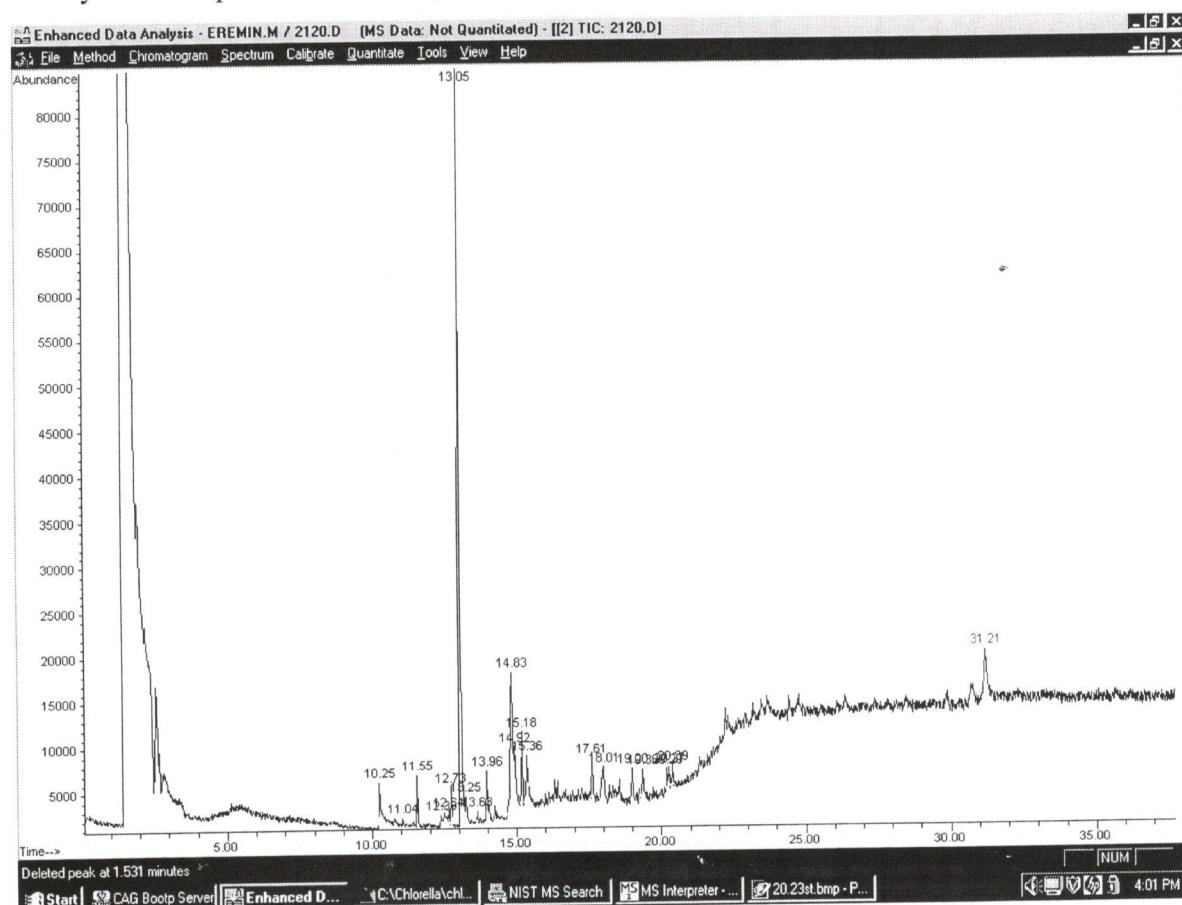


Рис. 8 Хроматограмма гомогенизированной Chlorella.

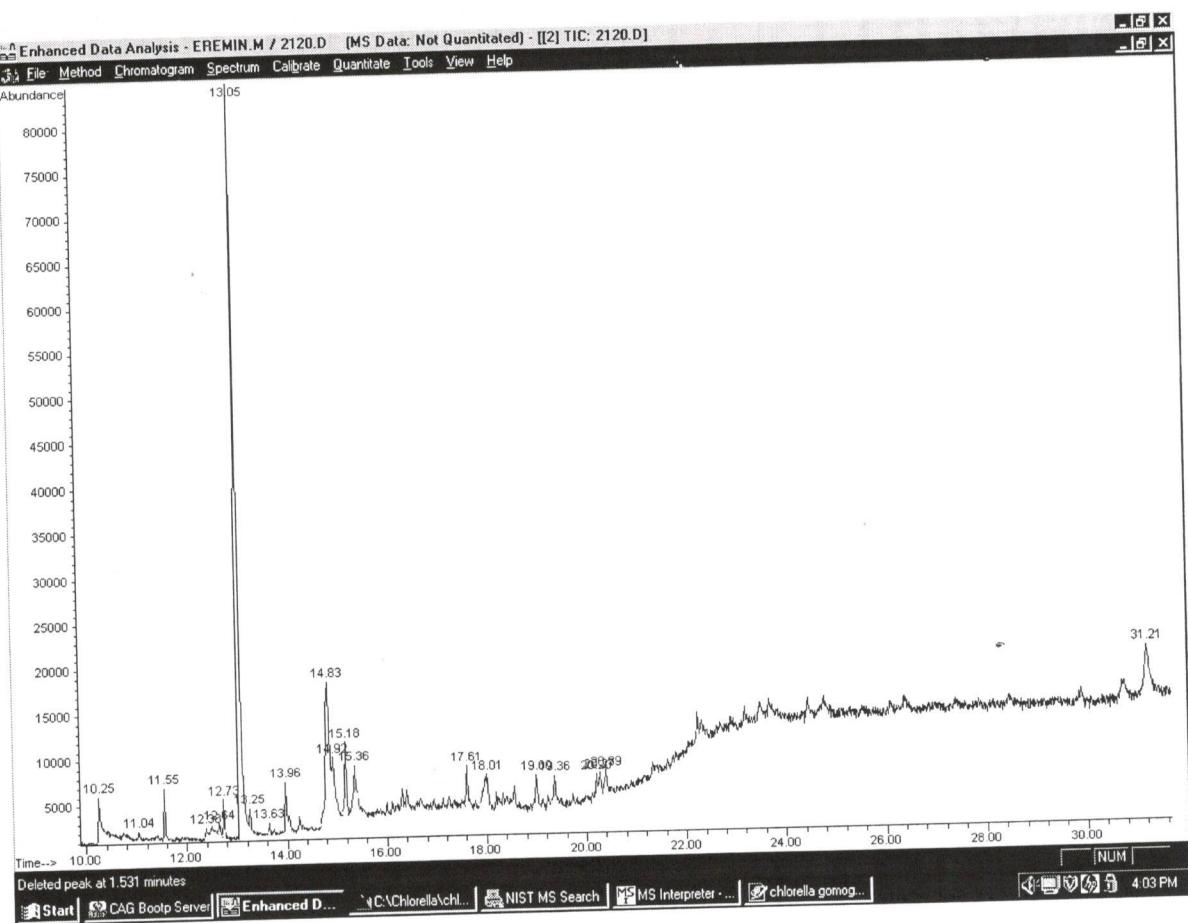
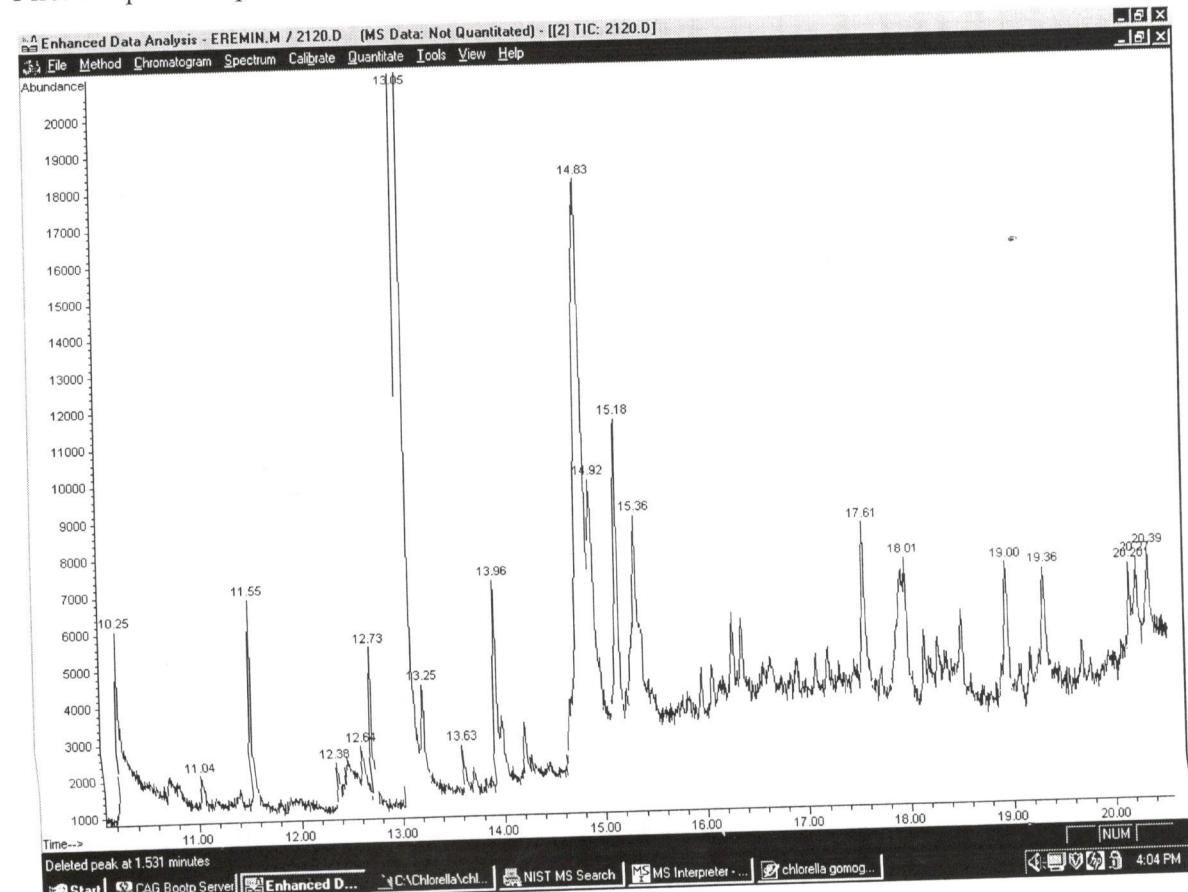
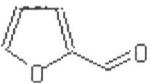
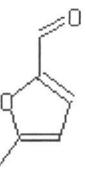
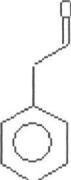
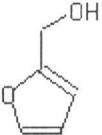
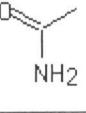
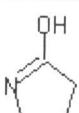


Рис. 9 Хроматограмма гомогенизированной Chlorella. Увеличенный масштаб.



Т а б л и ц а 4 – Идентификация веществ, обнаруженных в гомогенизированной Chlorella

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %	
1	10.247	2-Heptanamine, 5-methyl-	227511	4.213	50	
2	11.551	1-гидроксипропанон-2	79801	1.478	9	
3	12.377	Не идентифицируется	14119	0.261		
4	12.639	Furfural		20727	0.384	78
5	12.731	2-этилгексанол-1	60121	1.113	72	
6	13.046	Уксусная кислота	2192166	40.590	90	
7	13.245	Не идентифицируется	35335	0.654		
8	13.633	Октанол-1	19455	0.360	50	
9	13.965	Пропановая кислота	120236	2.226	87	
10	14.028	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-		41893	0.776	86
11	14.249	2-метилпропановая кислота	22975	0.425	50	
12	14.836	Бензацетальдегид		896645	16.602	90
13	14.924	Пентановая кислота	257589	4.770	72	
14	15.180	2-Furanmethanol		182858	3.386	80
15	15.363	Не идентифицируется	196866	3.645		
16	16.306	Не идентифицируется	38440	0.712		
17	16.404	Ацетамид		28884	0.535	72
18	17.606	Phytol		89000	1.648	43

19	18.010	Не идентифицируется	215902	3.998	
20	18.998	Фенол	94108	1.743	91
21	19.361	2-Pyrrolidinone 	74678	1.383	59
22	20.197	Не идентифицируется	37040	0.686	
23	20.273	Не идентифицируется	49973	0.925	
24	20.389	Не идентифицируется	44146	0.817	
25	22.232	Октадеканол-1	50405	0.933	58
26	31.207	Гексадекановая кислота	309858	5.737	70

Проба 481 (3 – Культуральная жидкость цианобактерий)

Пробоподготовка 1:

К 400 мл пробы добавили 90 г NaCl, довели pH до 9-10 (по индикаторной бумаге) раствором NaOH и провели экстракцию 20 мл хлористого метилена в течении 10 мин. Экстракт слили. Затем довели pH раствора до 2-3 концентрированной серной кислотой и провели экстракцию 20 мл хлористого метилена из кислой среды. Экстракты из щелочной и кислой среды объединили, пропустили через слой обезвоженного Na₂SO₄ для осушки и упарили до 1 мл на ротационном испарителе.

Экстракт анализировали на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой EC-1 15м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис 11-12 и таблице 5.

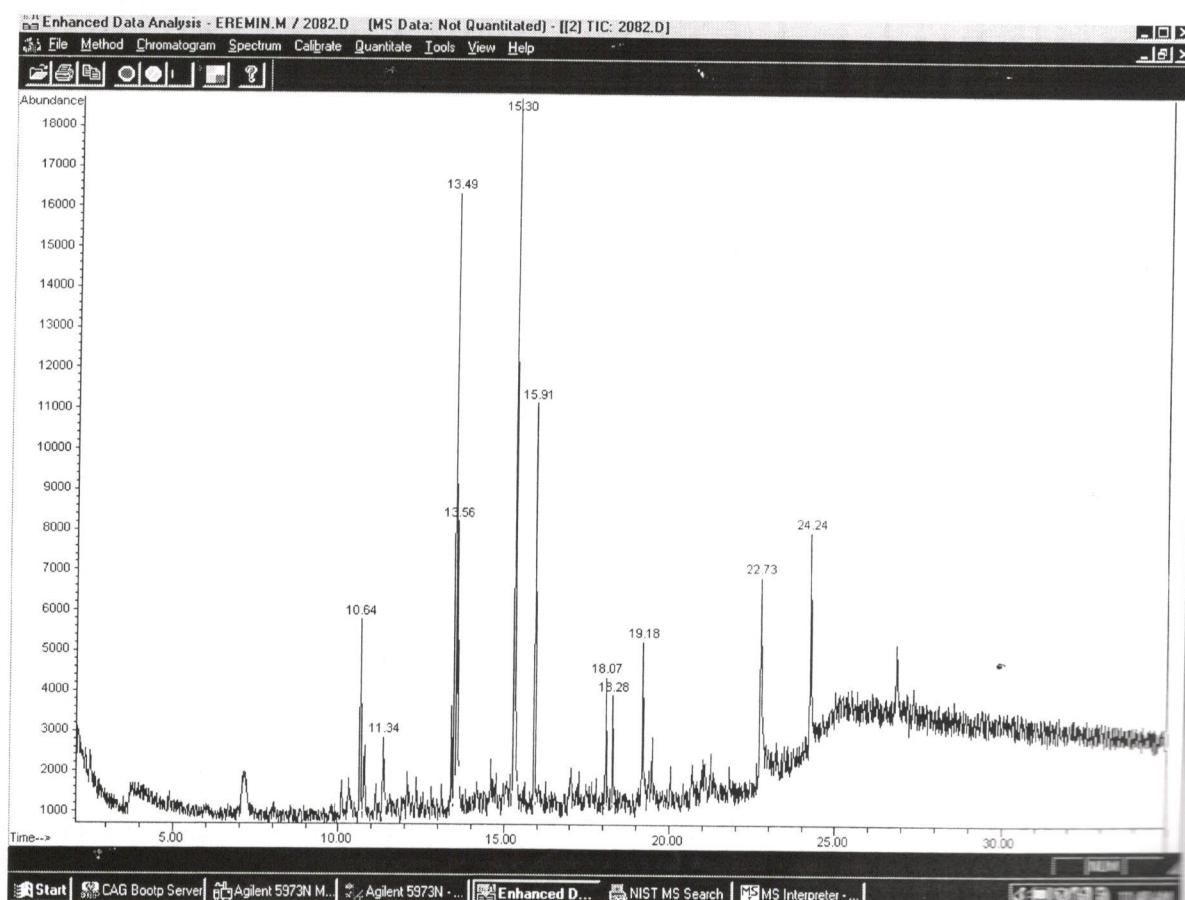


Рис. 11 Хроматограмма экстракта культуральной жидкости цианобактерий.

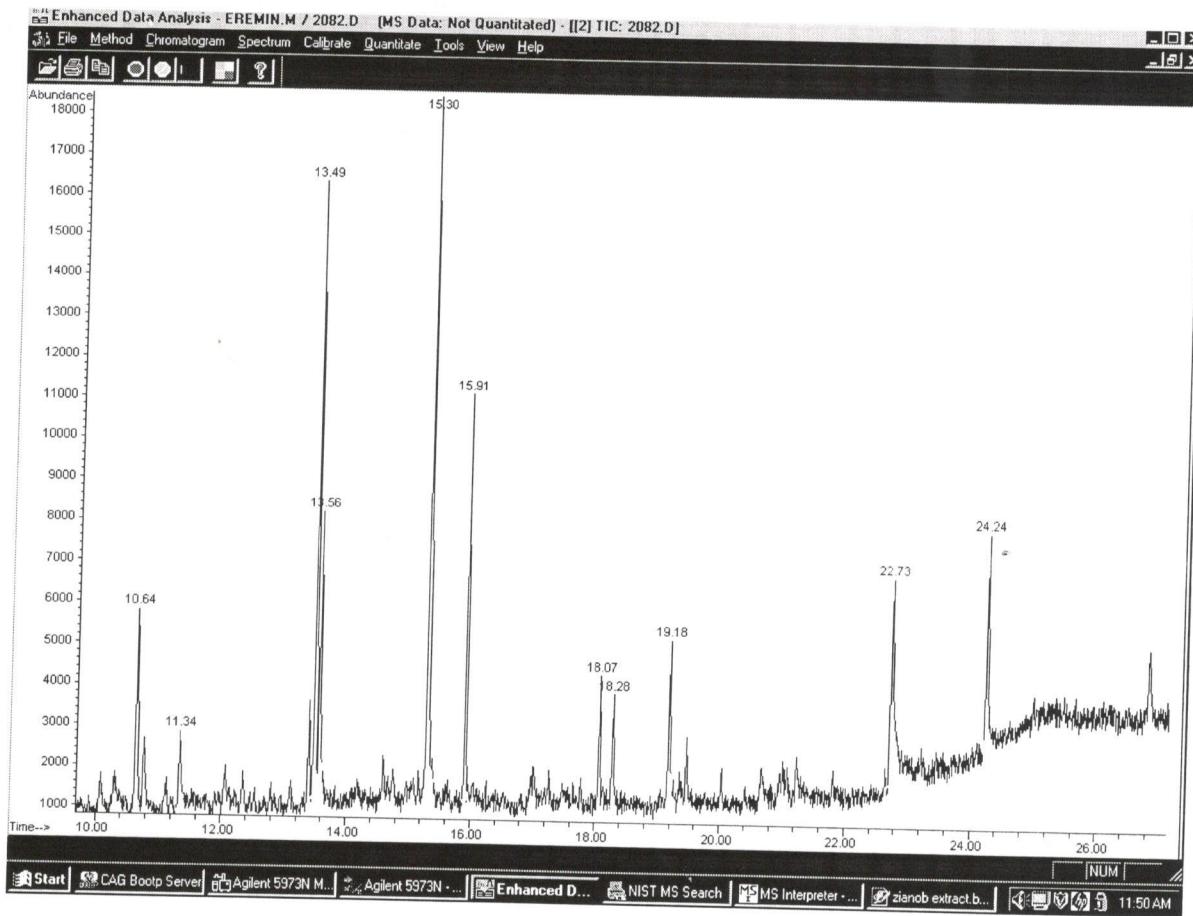


Рис. 12 Хроматограмма экстракта культуральной жидкости цианобактерий.
Экстрагент – хлористый метилен. Увеличенный масштаб.

Т а б л и ц а 5 – Идентификация веществ, обнаруженных в экстракте культуральной жидкости цианобактерий.

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	10.64	додекан	103000	8,1	92
2	11.34	Фталевый ангидрид 	34000	2,7	90
3	13.49	тетрадекан	239000	18,8	95
4	13.56	Не идентифицируется	110000	8,7	
5	15.30	диэтилфталат	315000	24,8	95
6	15.91	гексадекан	137000	10,8	93
7	18.07	Октадекан или другой декан	48000	3,8	
8	18.28	Ди-2-метилпропилфталат	44000	3,5	64
9	19.18	дибутилфталат	59000	4,7	80

10	22.73	9-октадеценамид	99000	7,8	64
11	24.24	дизооктилфталат	80000	6,3	86

Пробоподготовка 2:

Пробоподготовка не проводилась.

Проба анализировалась на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой ZB-WAX 30м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис 13 -16 и таблице 6.

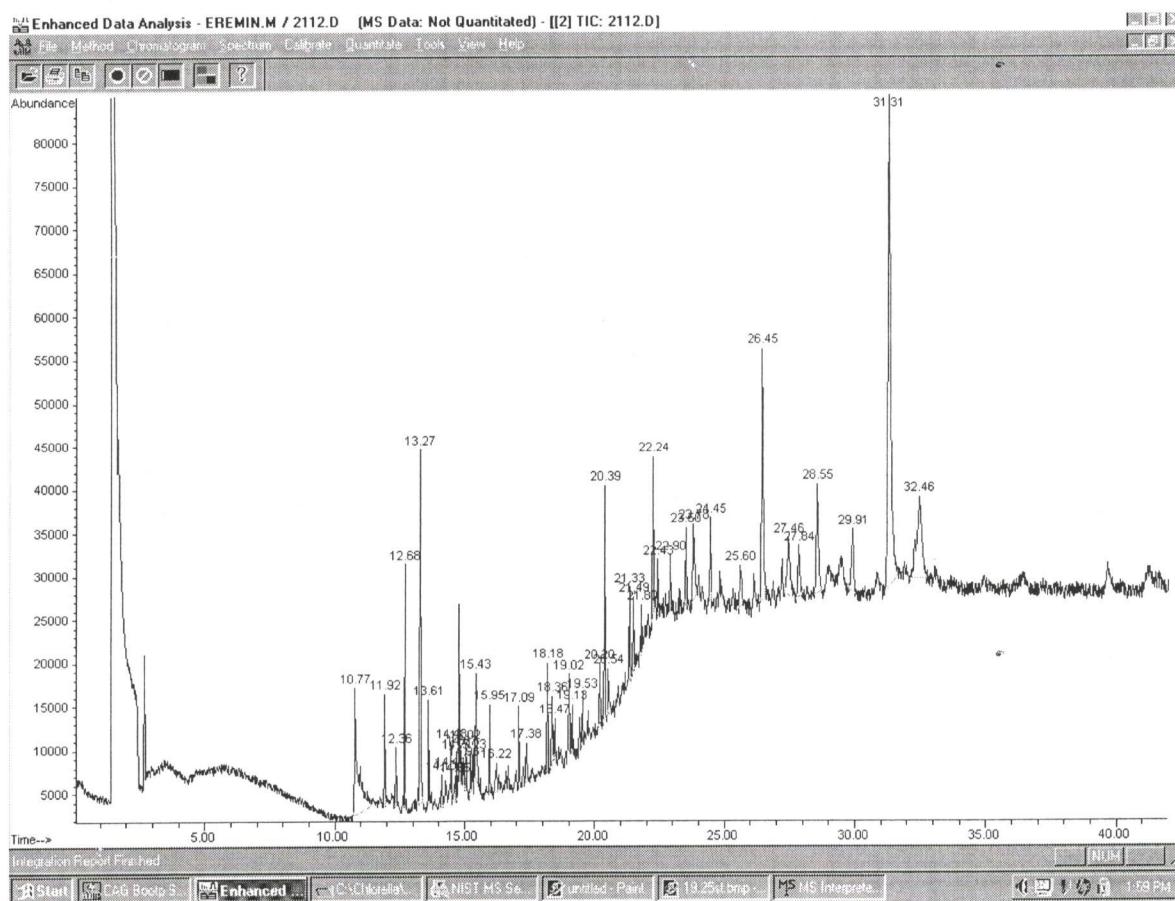


Рис. 13 Хроматограмма культуральной жидкости цианобактерий.

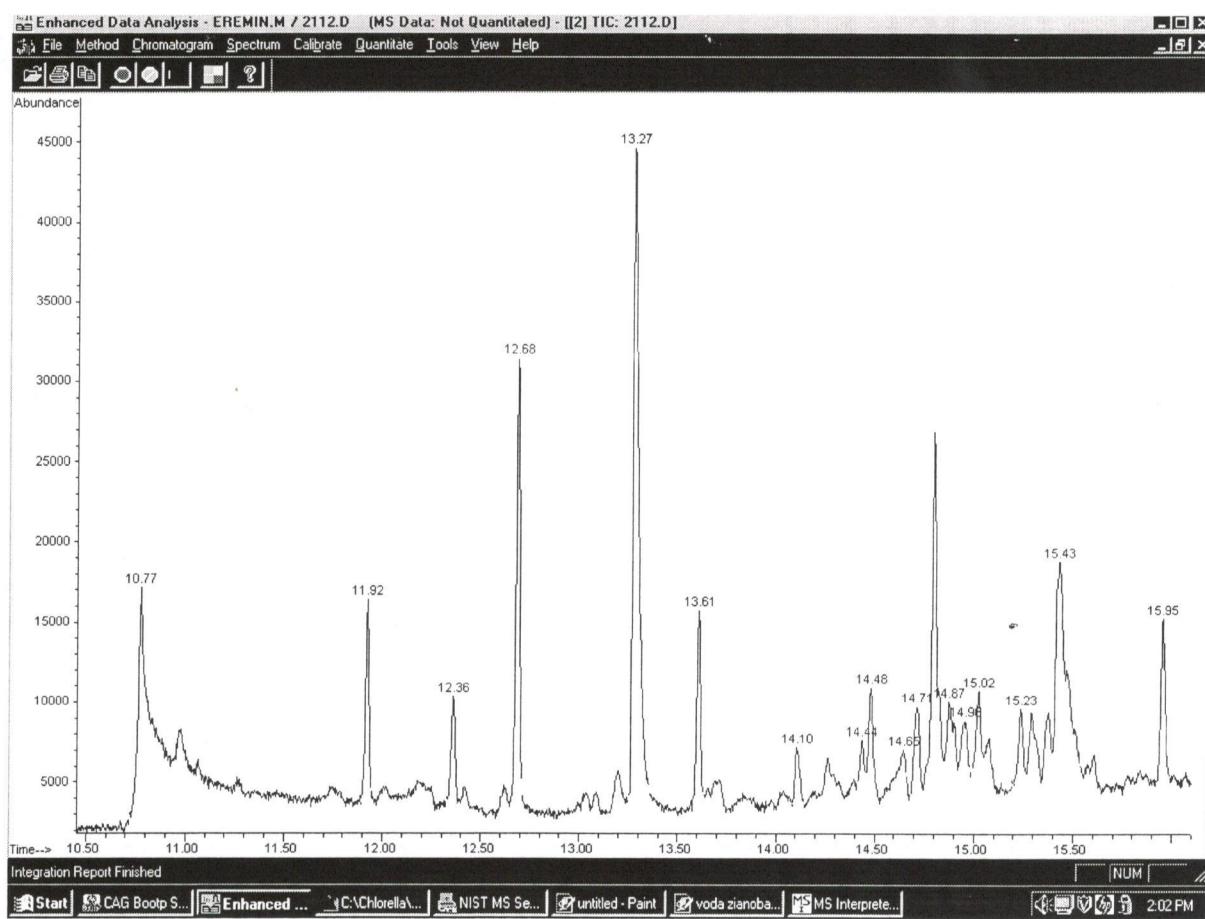


Рис. 14 Хроматограмма культуральной жидкости цианобактерий. Первая треть хроматограммы

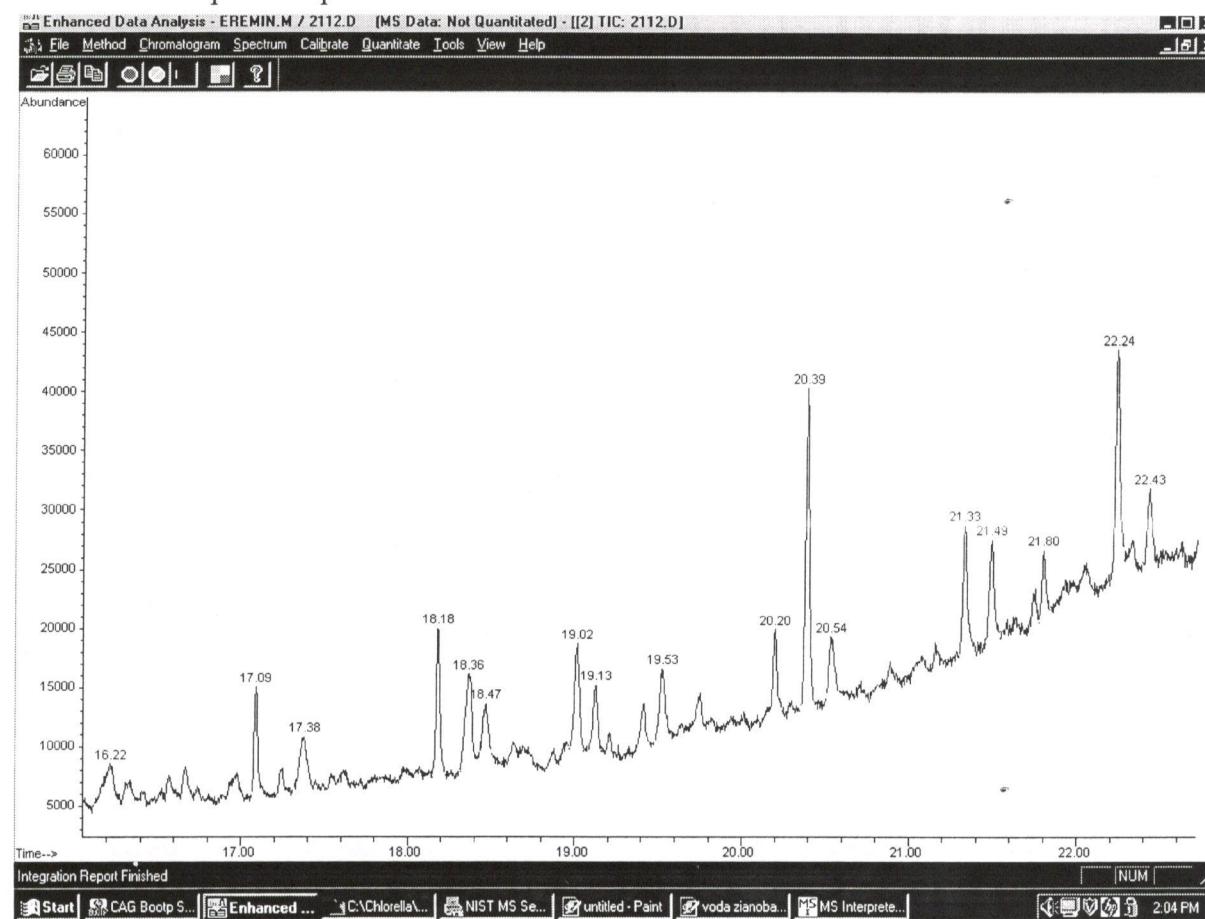


Рис. 15 Хроматограмма культуральной жидкости цианобактерий. Вторая треть хроматограммы

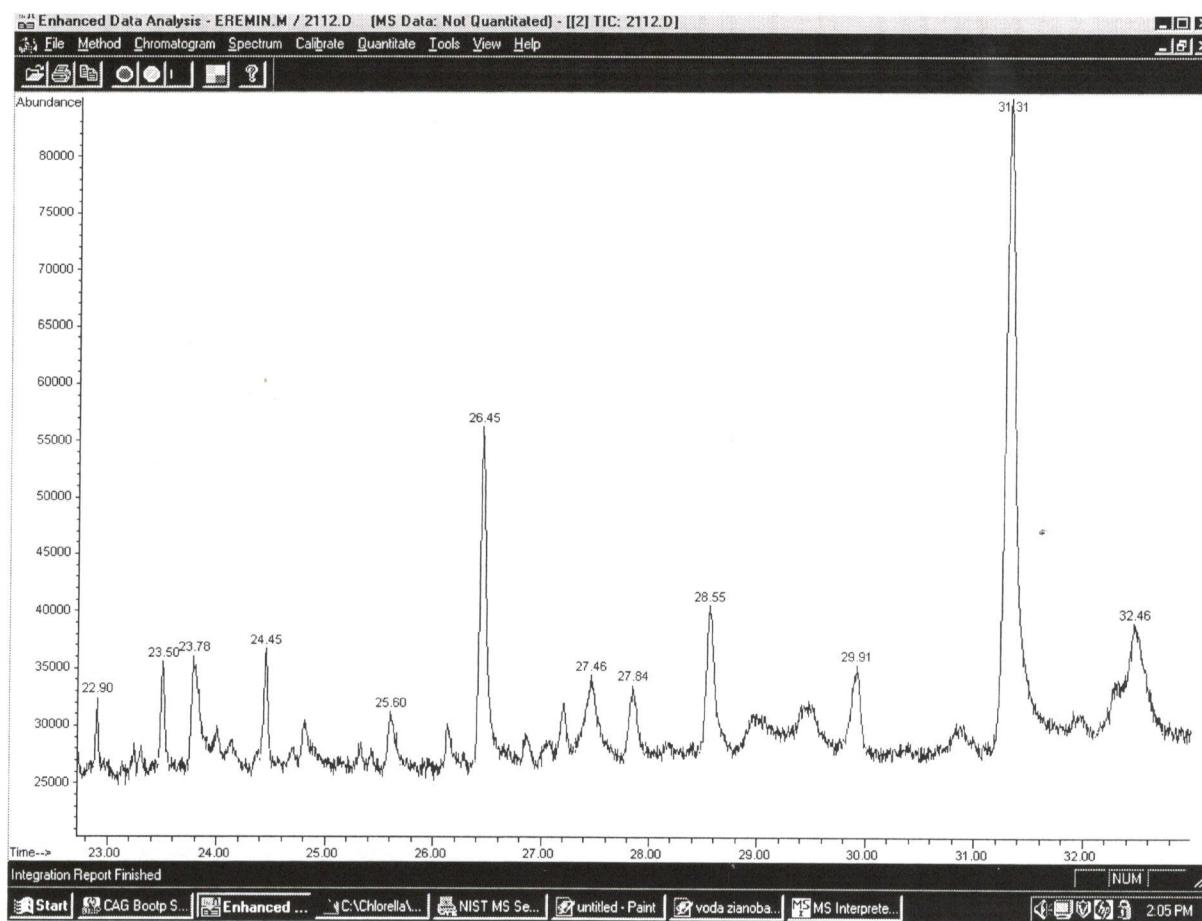
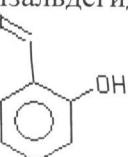


Рис. 16 Хроматограмма культуральной жидкости цианобактерий. Третья треть хроматограммы

Т а б л и ц а – 6 Идентификация веществ, обнаруженных в культуральной жидкости цианобактерий

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	10.773	Benzeneethanamine,2,5-difluoro-,beta,3,4-trihydroxy-N-methyl 	1270000	7,6	52
2	11.92	1-гидроксипропанон-2	159000	1,0	9
3	12.36	Гептанол-1	99241	0,6	72
4	12.685	2-этилгексанол-1	383948	2,3	78
5	13.273	Уксусная кислота	841331	5,0	83

6	13.606	Октанол-1	161033	1,0	80
7	14.103	Пропановая кислота	58113	0,3	80
8	14.436	1,2,3-триметилциклогексан	30091	0,2	90
9	14.481	Пропандиол-1,2	81532	0,5	80
10	14.647	Не идентифицируется	93154	0,6	
11	14.710	2-изобутил-3-метил-пентен-1	93675	0,6	62
12	14.80	1-метил-2-октилциклопропан	315000	1,9	86
13	14.874	Не идентифицируется	84681	0,5	
14	14.955	Не идентифицируется	64530	0,4	
15	15.025	Бутановая кислота	79498	0,5	86
16	15.232	2-гидроксибензальдегид 	68303	0,4	81
17	15.424	Пропен-2-овая кислота	406344	2,4	72
18	15.952	1-бутил-2-этилцикlobутан	152108	0,9	74
19	16.220	Пентановая кислота	137966	0,8	59
20	17.091	Ундеан	125168	0,7	91
21	17.380	Гептановая кислота	140606	0,8	53
22	18.179	Циклододекан	193690	1,2	94 %
23	18.364	Додеканол-1	200349	1,2	91 %
24	18.468	Гептановая кислота	96674	0,6	72 %
25	19.015	Фенол	181624	1,1	90 %
26	19.126	Не идентифицируется	104508	0,6	
27	19.525	Октановая кислота	137621	0,8	93 %
28	20.201	Октадекен-1	107258	0,6	94 %
29	20.396	Тетрадеканол-1	442157	2,6	91 %
30	20.534	Нонановая кислота	113972	0,7	90 %
31	21.330	Октадекен-9	198399	1,2	94 %
32	21.494	Декановая кислота	163452	1,0	52 %
33	21.802	Тетрадекен-5	83981	0,5	70 %
34	22.239	Циклотетрадекен	325515	1,9	95 %
35	22.431	Не идентифицируется	122070	0,7	
36	22.903	Не идентифицируется	83998	0,5	
37	23.506	Додекановая кислота	213638	1,3	90 %
38	23.783	Бензойная кислота	403665	2,4	83 %
39	24.453	Гексадеканол-1	224445	1,3	90 %
40	25.601	Не идентифицируется	198919	1,2	
41	26.447	Тетрадекановая кислота	1210106	7,2	95 %
42	27.456	Не идентифицируется	480231	2,9	
43	27.843	Не идентифицируется	289997	1,7	
44	28.548	Пентадекановая кислота	656591	3,9	94 %

45	29.913	Не идентифицируется	382234	2,3	
46	31.312	Гексадекановая кислота	3941734	23,6	98 %
47	32.463	Не идентифицируется	1318020	7,9	

Проба 482 (4 – Гомогенизированные цианобактерии)

Пробоподготовка 1:

Клетки цианобактерий предварительно осажденные на центрифуге, но не высушенные, растерли в ступке с толченым стеклом. Затем к полученной массе добавили хлористый метилен (объем массы клеток : объем $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1 : 1$) и экстрагировали в течение 10 мин. Далее полученную смесь расслоили на центрифуге и экстракт проанализировали на хроматографе.

Экстракт анализировался на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой EC-1 15м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис 17 - 18 и в таблице 7.

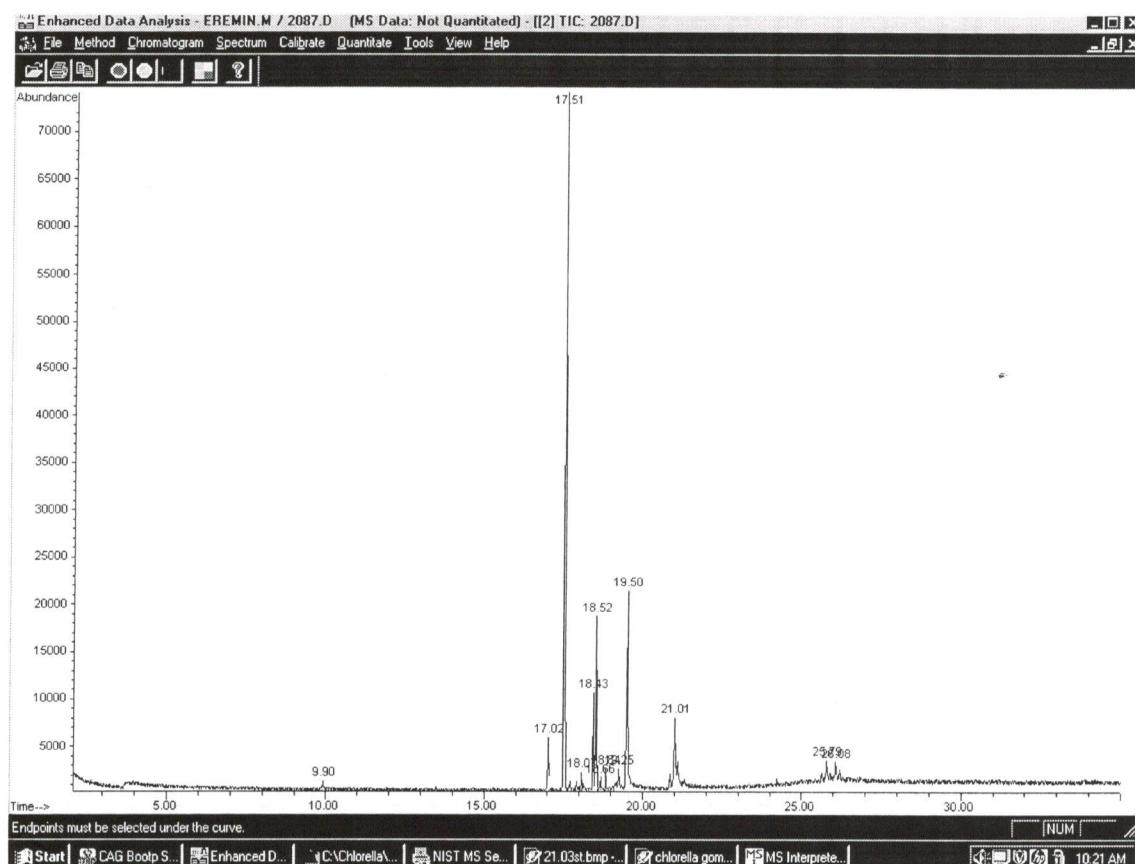


Рис. 17 Хроматограмма экстракта гомогенизированных цианобактерий.

Экстрагент – хлористый метилен.

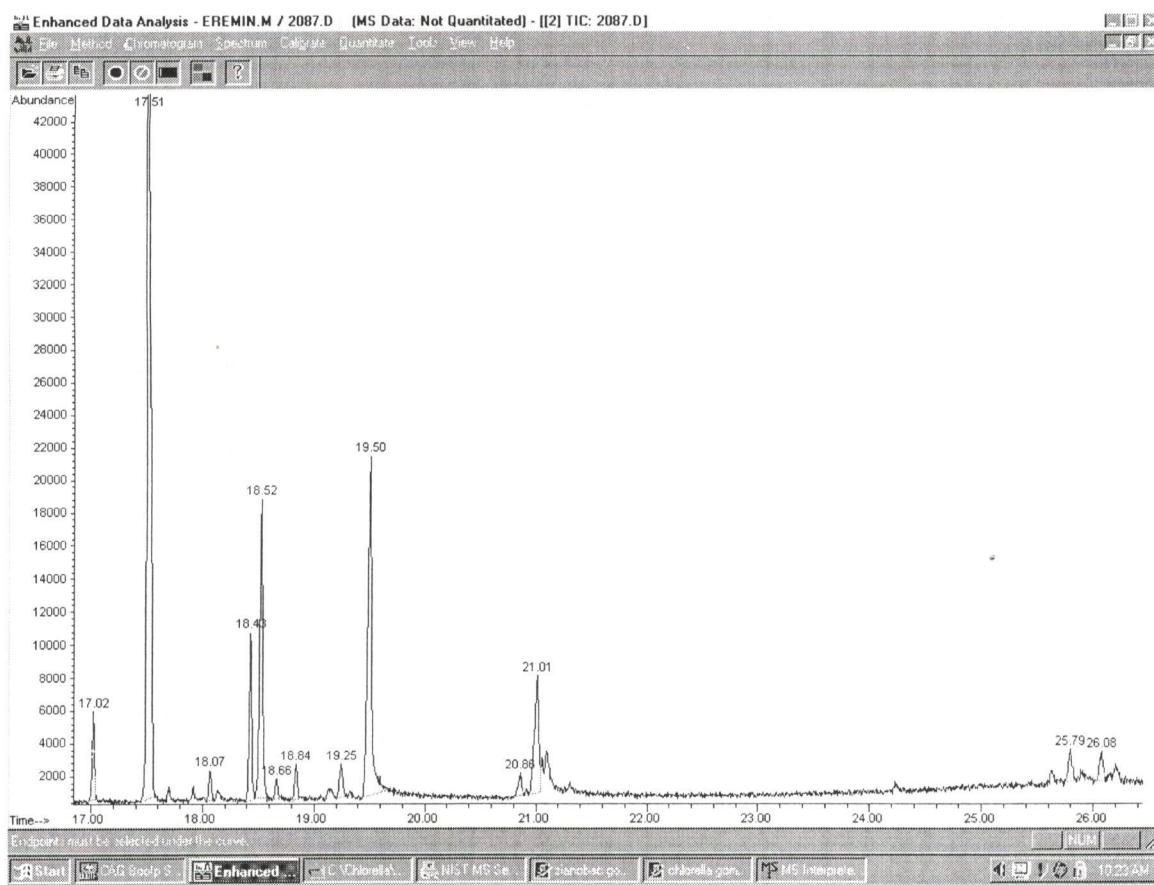


Рис. 18 Хроматограмма экстракта гомогенизированных цианобактерий.
Экстрагент – хлористый метилен. Увеличенный масштаб.

Т а б л и ц а – 7 Идентификация веществ, обнаруженных в экстракте гомогенизированных цианобактерий

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика	Доля площади пика от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	9.9	Не идентифицируется	16000	0,6	
2	17.03	Нонадекан	71000	2,5	83
3	17.51	7-метилпентадекан	1385000	48,1	86
4	18.07	Не идентифицируется (возможно какой-то декан)	27000	0,9	
5	18.43	Bicyclo(3.1.1)heptan,2,6,6-trimethyl-	151000	5,2	35



6	18.52	2-метил-8-пропилдодекан	332000	11,5	90
7	18.66	Не идентифицируется	19000	0,7	
8	18.84	Не идентифицируется	33000	1,1	
		Оксоциклотридекан-2-он			
9	19.25		43000	1,5	53
10	19.50	Гексадекановая кислота	498000	17,3	97
11	20.85	Не идентифицируется	28000	1,0	
12	21.01	9,12,15-октадекантриен-1-ол	193000	6,7	87
13	25.79	Не идентифицируется	44000	1,5	
14	26.08	Не идентифицируется	40000	1,4	

Пробоподготовка 2:

Клетки цианобактерий предварительно осажденные на центрифуге, но не высушенные, растерли в ступке с толченым стеклом. Далее полученную смесь расслоили на центрифуге и водный раствор над осадком проанализировали на хроматографе.

Проба анализировалась на хромато-масс-спектрометре Agilent GC 6890 / MS 5973 N с капиллярной колонкой ZB-WAX 30м*0,25мм*0,25мкм. Режим сканирования 42-300 а.е.м.

Результаты представлены на рис 8-10 и таблице 8.

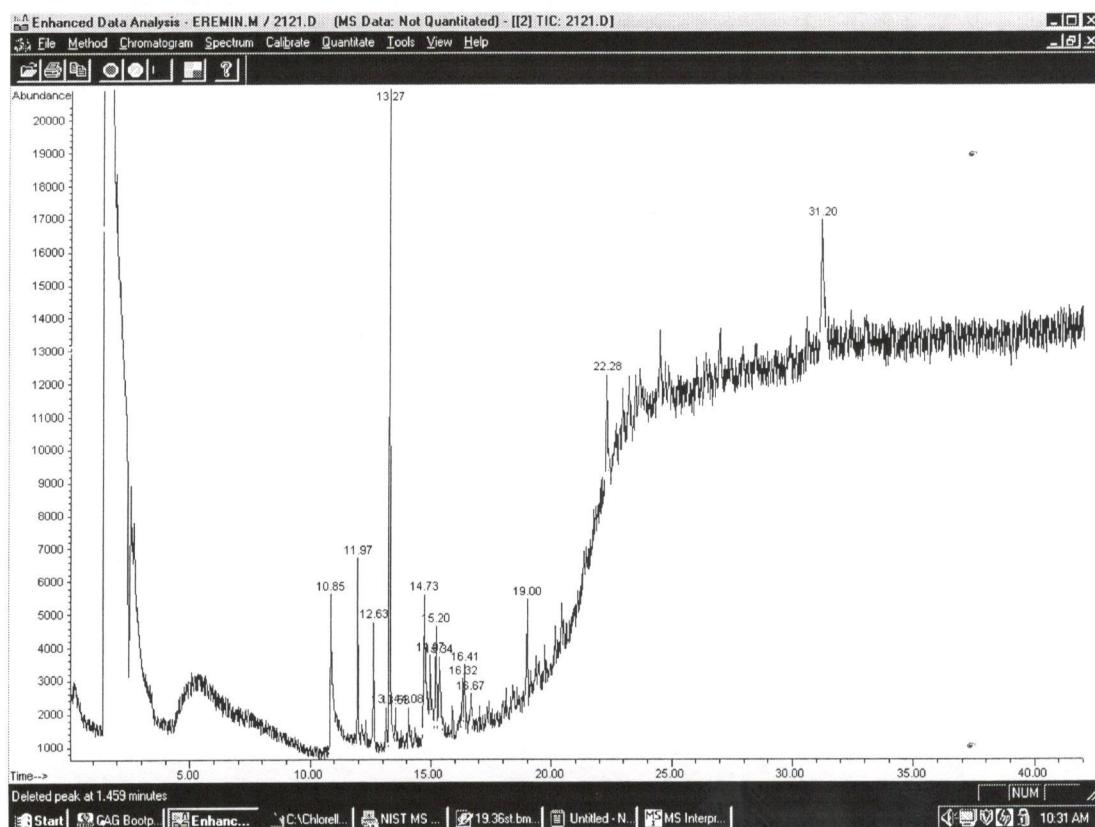


Рис. 19 Хроматограмма гомогенизированных цианобактерий.

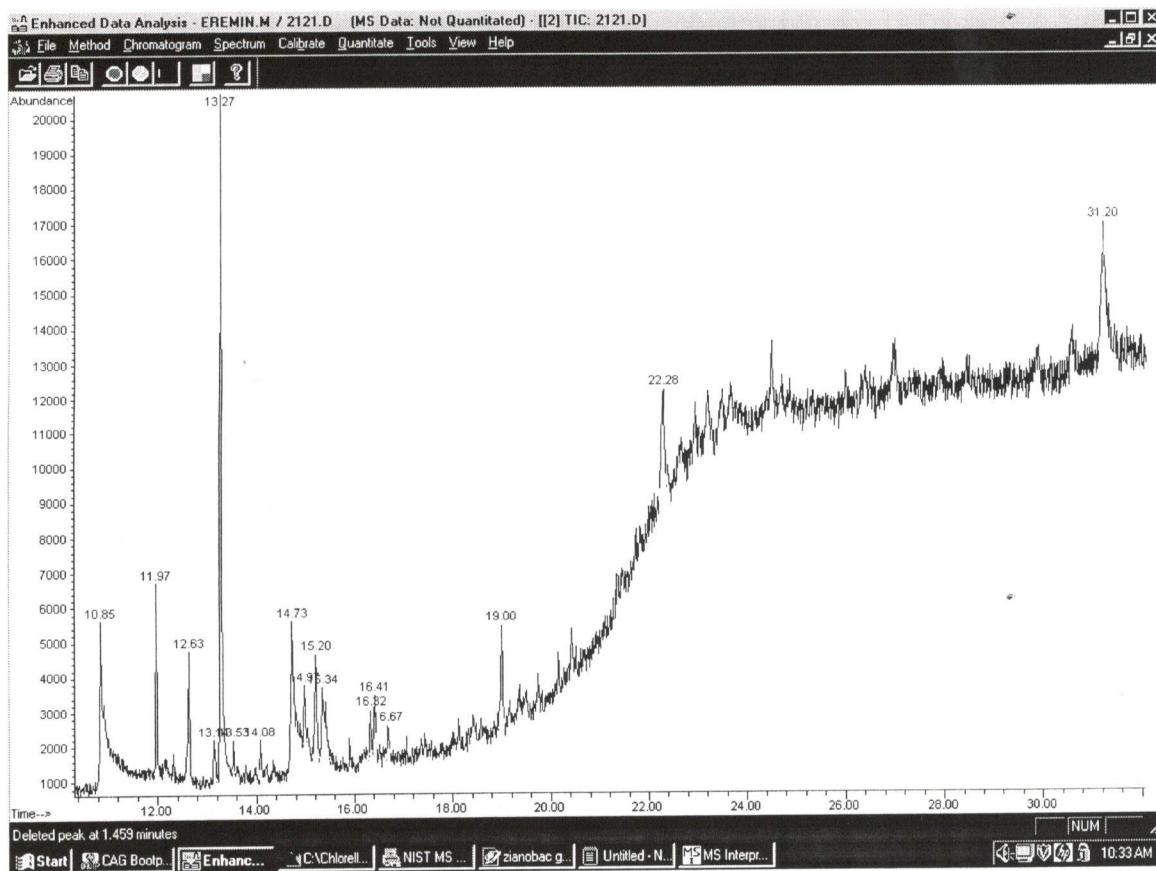


Рис. 20 Хроматограмма гомогенизированных цианобактерий. Увеличенный

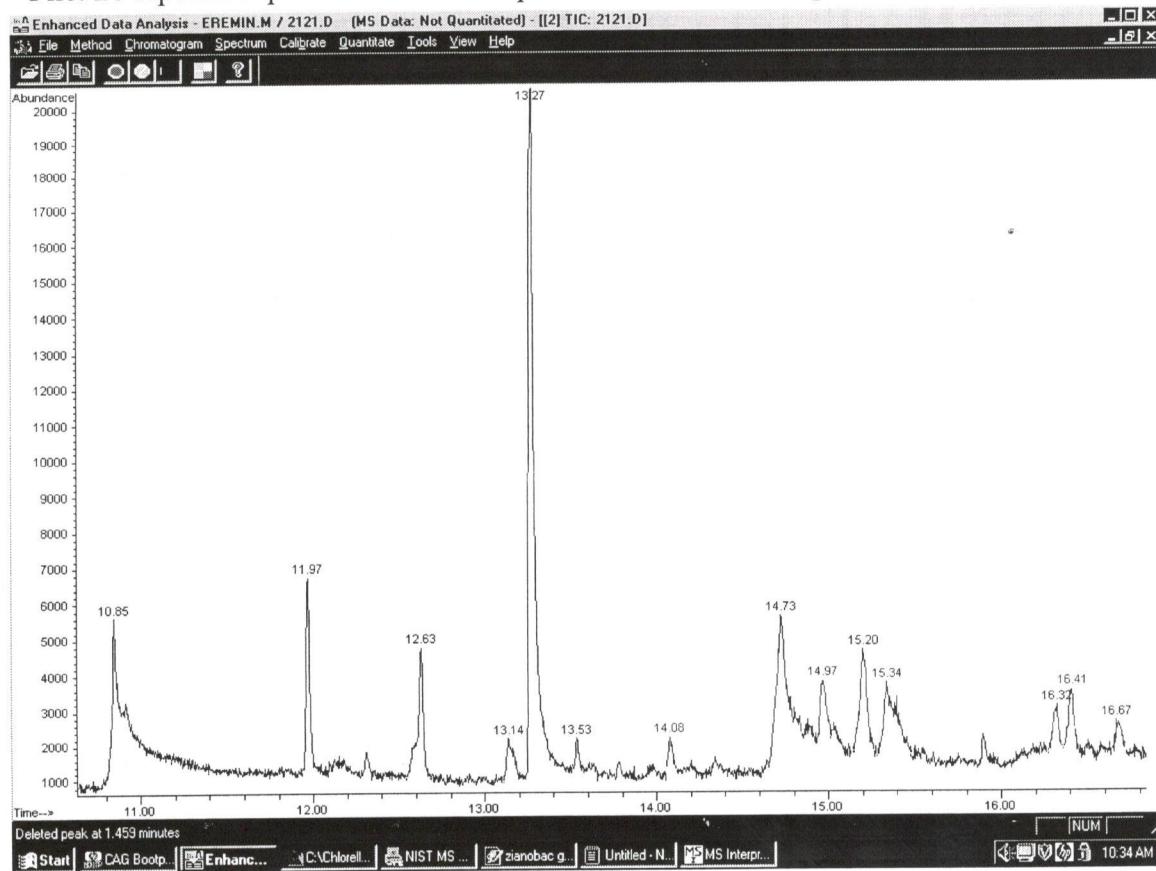


Рис. 21 Хроматограмма гомогенизированных цианобактерий. Увеличенный масштаб.

Т а б л и ц а – 8 Идентификация веществ, обнаруженных в гомогенизированных цианобактериях

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь	Доля площади от общей площади пиков, %	Вероятность идентификации, %
1	10.847	Не идентифицируется	345247	18,0	
2	11.970	1-гидроксипропанон-2	81082	4,2	72
3	12.630	2-этилгексанол-1	81113	4,2	47
4	13.138	Бензальдегид	26886	1,4	87
5	13.271	Уксусная кислота	475558	24,9	90
6	13.536	Не идентифицируется	10325	0,5	
7	14.078	Пропановая кислота	17217	0,9	64
8	14.725	Не идентифицируется	163953	8,6	
9	14.971	Пентановая кислота	39572	2,1	33
10	15.205	2-Furanmethanol	85484	4,5	76
11	15.341	пропен-2-овая кислотая	96706	5,1	9
12	15.896	Не идентифицируется	10440	0,5	
13	16.325	Не идентифицируется	25751	1,3	
14	16.413	Ацетамид	35823	1,9	72
15	16.669	Не идентифицируется	19131	1,0	
16	19.001	Фенол	64852	3,4	91
17	22.286	Диэтилфталат	112962	5,9	78
18	31.204	Гексадекановая кислота	220750	11,5	60

Исполнитель:

Ведущий инженер

Д.В. Ерёмин

Приложение В

**Тест по влиянию культуры хлореллы на культуры синезеленых водорослей
(протокол наблюдений)**

14.03		22.03		28.03		4.04		24.04.	
303 Хл прикрепилась к стенке, не с/з	303 К сильно прикрепилась к стенке, с/з	303 Хл небольшой рост на стенке, с/з	303 К обильный рост на стенке, с/з	303 Хл стенка заросла на 1/3 столбика, с/з, хл осела	303 К стенка заросла вся	303 Хл стенка заросла на 1/3, с/з	303 Кстенка заросла вся	303 Хл стенка заросла на 1/2	303 Кстенка заросла полностью, подсохла, начала разлагаться
657 Хл прикрепилась к стенке, бурая	657 К прикрепилась к стенке, бурая	657 Хл, бурый, нет роста на стенке	657 К бурый, обильный рост на стенке	657 Хл на стенке роста нет, Oscillatoria высохла, хл осела	657 К стенка заросла вся	657 Хл на стенке роста нет	657 К образовалась дерновинка от стенки к стенке	657 Хл погибла	657 К сконцентрировалась внизу
660 Хл прикрепилась к стенке	660 К прикрепилась к стенке	660 Хл не обильный рост на стенке	660 К очень обильный рост на стенке	660 Хл стенка заросла на ½, хл осела	660 К стенка заросла вся	660 Хл стенка заросла вся	660 К стенка заросла вся	660 Хл заросли одинаково	660 К
729 Хл прикрепилась к стенке, с/з	729 К прикрепилась к стенке, с/з	729 Хл прикреплена к стенке, но не поползла вниз, сконц. в клубочке, не с/з	729 К прикреплена к стенке, поползла вниз, с/з	729 Хл сконцентрирована в клубок, по стенке не ползет, хл осела	729 К ползет по стенке, обильный рост	729 Хл не ползет по стенке	729 Кстенка заросла вся	729 Хл погибла	729 К сконцентрировалась вверху
799 Хл лежит на дне, не с/з	799 К лежит на дне, с/з	799 Хл лежит на дне, не с/з	799 К лежит на дне, с/з, рост на стенку вверх	799 Хл роста нет, хл осела	799 К рост снизу вверх, медленный	799 Хл роста нет	799 К медленный рост снизу	799 Хл лежит внизу	799 К лежит внизу (погибла?)
902 Хл лежит на дне	902 К лежит на дне	902 Хл отмерла	902 К рост на стенке	902 Хл слабый рост вверху, хл осела	902 К рост на стенке	902 Хл слабый рост у кромки воды	902 К сильный рост на стенке	902 Хл стенка заросла вся	902 Кстенка заросла вс
1414 Хл прикрепилась к стенке, с/з	1414 К прикрепилась к стенке, с/з	1414 Хл сконцентрирована в клубочке, нет роста на стенке, не с/з	1414 К рост на дне, рост на стенке, с/з	1414 Хл сконцентрирована в клубок, слабый рост на стенке, хл осела	1414 К сконцентрирована в клубок, рост на стенке	1414 Хл небольшой рост у кромки воды	1414 К рост на стенке	1414 Хл погибла	1414 Кстенка заросла вся
1415 Хл не прикрепилась к стенке, не с/з	1415 К прикрепилась к стенке	1415 Хл рост на стенке, не с/з	1415 К рост на стенке, с/з	1415 Хл слабый рост на стенке вверху, хл осела	1415 К сильный рост на стенке вверху до 1/3	1415 Хл рост на стенке сверху до 1/3	1415 К рост в толще	1415 Хл стенка заросла вся	1415 К стенка заросла вся
1416 Хл прикрепилась к стенке, с/з	1416 К прикрепилась к стенке, с/з	1416 Хл не обильный рост на стенке	1416 К обильный рост на стенке, с/з	1416 Хл слабый рост на стенке, хл осела	1416 К обильный рост на стенке	1416 Хл несплошной рост на стенке	1416 К стенка заросла	1416 Хл стенка заросла вся, дерновинка сформирована	1416 К стенка заросла вся, дерновинка сформирована
535 Хл не с/з в толще	535 К с/з в толще	535 Хл с/з в толще	535 К с/з в толще	535 Хл с/з в толще, мутный	535 К с/з в толще, прозрачный	535 Хл с/з в толще, осела на стенки	535 Хл темно-зеленая в толще, осела на стенки	535 Хл темно-зеленая в толще	535 К темно-зеленая в толще, осела на стенки
972 Хл не с/з в толще воды	972 К не с/з в толще воды	972 Хл с/з в толще	972 К с/з в толще	972 Хл светло-зеленый в толще, вода посыпала слабее, чем в контроле	972 К желто-зеленый в толще, вода посыпала заметно	972 Хл светло-зеленый в толще	972 К светло-зеленый в толще	972 Хл все осело	972 К светло-зеленая в толще

Сокращения: Хл – хлорелла, К – контроль, с/з – сине-зеленый цвет. Число обозначает номер культуры.