

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятская государственная сельскохозяйственная академия»

На правах рукописи

ГОРНОСТАЕВА ЕЛЕНА АНАТОЛЬЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ И НИКЕЛЯ НА ПОЧВЕННЫЕ
ЦИАНОБАКТЕРИИ И ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА**

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Л.И. Домрачева

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК И МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ	11
1.1. Изменение анатомо-морфологических показателей микроорганизмов	12
1.2. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимические показатели микробных клеток	17
1.3. Механизмы микробиологической детоксикации тяжелых металлов	22
1.4. Роль микроорганизмов в биоремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами	29
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Цианобактерии и высшие растения, используемые в лабораторных и полевых опытах	36
2.2. Характеристика районов исследования	37
2.2.1. Характеристика почв на территории Кирово - Чепецкого химического комбината	37
2.2.2. Экологическая характеристика почв г. Владикавказа и почв на территории горно-металлургического комбината	40
2.3. Традиционные методы исследования	42
2.3.1. Методика отбора почвенных проб для микробиологического и химического анализа	42
2.3.2. Методы исследования почвенной биоты	43
2.3.3. Методы исследования химических характеристик субстратов	44
2.3.4. Новые разработки	48
2.3.5. Методика микрополевого опыта	54
2.3.6. Статистическая обработка и достоверность результатов	54
ГЛАВА III. СПЕЦИФИКА МИКРОБНЫХ ГРУППИРОВОК ПОЧВ И ГРУНТОВ ТЕХНОГЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ	57
3.1. Химическое загрязнение почв и грунтов техногенных территорий	57
3.2. Состояние микробных комплексов почв техногенных территорий	60
3.3. Структура микробных фототрофных комплексов в почвах, загрязненных тяжелыми металлами	65
3.4. Микологическая индикация химически загрязненных почв	66
3.5. Биотестирование токсичности почв с использованием цианобактерии <i>Nostoc linckia</i>	67
3.6. Развитие почвенных микробоценозов в условиях свинцового стресса	69
3.7. Оценка уровня загрязнения почвы с использованием интегральных показателей загрязнения	73
ГЛАВА IV. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МЕДИ И НИКЕЛЯ НА АЛЬГОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ ПОЧВЕННЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ПРИРОДНЫЕ БИОПЛЕНКИ	78

4.1. Изучение влияния ионов меди и никеля на цианобактерию <i>Nostoc linckia</i>	78
4.1.1. Изменение биохемилюминесценции цианобактерии <i>Nostoc linckia</i> под влиянием меди	78
4.1.2. Влияние ионов никеля и нефтепродуктов на состояние цианобактерии <i>Nostoc linckia</i>	82
4.1.2.1. Определение жизнеспособности клеток цианобактерии	82
4.1.2.2. Изменение физиологических процессов <i>Nostoc linckia</i> под действием токсикантов	84
4.1.3. Количественное определение формазана в клетках цианобактерии <i>Nostoc linckia</i> при действии ионов меди (II) и никеля (II)	87
4.1.4. Особенности накопления ионов меди (II) и никеля (II) в различных фракциях гомогената клеток цианобактерии <i>Nostoc linckia</i>	89
4.2. Потенциал природных биопленок <i>Nostoc commune</i> как сорбентов тяжелых металлов в водной среде	93
4.2.1. Самосборка природных биопленок с доминированием <i>Nostoc commune</i>	94
4.2.2. Исследование видового, группового состава и содержания тяжелых металлов в биопленках из различных экотопов	99
4.2.3. Выявление физиолого-биохимического отклика комплекса микроорганизмов, входящих в состав биопленок <i>Nostoc commune</i> , на воздействие испытываемых поллютантов	101
4.2.4. Определение сорбционной способности биопленок по отношению к ионам никеля (II) и меди (II) при различных условиях контактирования	106
4.2.5. Коэффициенты корреляции – возможные показатели загрязнения сред тяжелыми металлами	109
4.3. Изучение физиолого-биохимического отклика и сорбционных способностей биопленок с доминированием р. <i>Phormidium</i> в условиях химического стресса	111
4.3.1. Функциональные возможности почвенных цианобактерий при воздействии ионов меди (II) и никеля (II)	111
4.3.1.1. Влияние ионов металлов на жизнеспособность клеток цианобактерий в биоклетках с доминированием ЦБ р. <i>Phormidium</i>	112
4.3.1.2. Влияние ионов металлов на каталазную активность	112
4.3.1.3. Влияние ионов меди и никеля на интенсивность перекисного окисления липидов	114
4.3.1.4. Влияние ионов меди и никеля на содержание хлорофилла <i>a</i> и феофитина	115
4.3.1.5. Влияние ионов меди никеля на интенсивность биохемилюминесценции почвенных цианобактерий	116
4.3.2. Сорбционные возможности почвенных биопленок с	119

доминированием цианобактерий р. <i>Phormidium</i> при воздействии ионов никеля (II) и меди (II)	119
4.3.2.1. Сорбционная способность почвенных цианобактерий в гомогенизированном и пленочном состоянии при воздействии тяжелых металлов	119
4.3.2.2. Влияние массы цианобактерий на остаточное содержание ионов меди (II) и никеля (II) в растворе	120
4.3.2.3. Влияние продолжительности контакта на остаточное содержание металлов в растворе	121
4.3.2.4. Влияние ионов меди (II) и никеля (II) на качественный состав органических веществ в культуральной жидкости биопленок с доминированием р. <i>Phormidium</i>	124
4.3.3. Влияние ионов меди (II) и никеля (II) на структуру поверхности клеток цианобактерии	127
ГЛАВА V. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РАСТЕНИЙ В ПОЧВАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ МЕДЬЮ	130
5.1. Исследование влияния возрастающих концентраций ионов меди (II) на почвенную альго-циано-микофлору	132
5.1.1. Влияние меди на развитие почвенной альго-циано-микофлоры под посевами пшеницы сорта Ирень	132
5.1.2. Изучение развития цианобактерий под различными культурами в почве, загрязненной ионами меди (II)	135
5.1.3. Влияние возрастающих концентраций ионов меди (II) на развитие почвенных микромицетов под посевами гороха сорта Лучезарный	137
5.2. Исследование влияния ионов меди (II) на урожайность культур высших растений при предпосевной цианобактериальной обработке семян	140
5.2.1. Влияние цианобактериальной обработки семян на урожайность пшеницы сорта Ирень при выращивании в условиях загрязнения почвы медью	141
5.2.2. Действие ионов меди (II) на урожайность гороха сорта Лучезарный при цианобактериальной обработке семян	142
5.2.3. Изучение влияния цианобактериальной инокуляции семян горчицы белой на урожайность при выращивании в медьзагрязненной почве	143
5.3. Действие ионов меди (II) на уровень накопления антоциановых пигментов высшими растениями	144
5.3.1. Влияние цианобактериальной обработки на содержание антоцианов в листьях пшеницы сорта Ирень в медьзагрязненной почве	144
5.3.2. Влияние предпосевной цианобактериальной обработки семян на содержание антоцианов в горохе сорта Лучезарный при условиях загрязнения почвы медью	146

5.3.3. Влияние ионов меди (II) при цианобактериальной инокуляции семян горчицы белой на уровень накопления антоцианов в листьях растений	147
5.4. Исследование влияния цианобактериальной обработки семян высших растений на уровень сорбции ионов меди (II) из загрязненной почвы	148
5.4.1. Влияние цианобактериальной обработки семян на уровень накопления ионов меди (II) в пшенице сорта Ирень	149
5.4.2. Влияние обработки семян гороха сорта Лучезарный цианобактериями на уровень поступления ионов меди (II) в надземную часть	150
5.4.3. Влияние цианобактериальной обработки семян горчицы белой на уровень поступления ионов меди (II) в вегетативную массу и семена горчицы белой	151
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	155
ПРИЛОЖЕНИЕ	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	160

ВВЕДЕНИЕ

Тяжелые металлы (ТМ) относятся к одним из главных загрязнителей окружающей среды (ОС) (Звягинцев и др., 2005; Фокина, 2008; Домрачева и др., 2010; Ерохина, 2012; Massaccesi, 2002; Ye et al., 2010; Antal, 2012). Источником ТМ являются промышленные предприятия, транспорт, сельское хозяйство и др. При этом выброс ТМ может иметь протяженность до 30–40 км (Ильин, Сысо, 2001). Хорошо известно, что ТМ в определенной концентрации необходимы для нормального функционирования живых организмов, однако, в больших количествах отрицательно влияют на ферментативные реакции и ингибируют многие жизненно важные процессы в клетках. Поэтому очистка ОС от избытка ТМ относится к числу значимых экологических проблем.

Помимо удаления ТМ химическими способами, существуют методы биологической очистки почвы от металлов, где активным компонентом являются микроорганизмы (МО). МО составляют основной генофонд, который противостоит изменениям биосферы (Евдокимова, 2014). Активно проводятся испытания по выявлению МО, обладающих высокой скоростью наращивания биомассы и способных сорбировать загрязняющие вещества, в которых действующим началом служат сапротрофные бактерии и микровицеты, а также многовидовые консорциумы (Жуйкова, 2007; Хрулева, 2010; Бушковский, 2011; Шабаев, 2014; Bhattachacharya et al., 2002; Cho Dae Naeng et al., 2003; Das et al., 2009). Появились исследования, в которых упор делается на цианобактериальный компонент подобных биопрепаратов. Цианобактерии (ЦБ) могут адаптироваться к экстремальным условиям благодаря своим биохимическим, физиологическим свойствам и возможности аккумулировать и обезвреживать различные ксенобиотики (Quintelas, Tavares, 2002; Morin et al., 2006; Choudhary et al., 2007; Yilmazer, Saracoglu, 2009; Ye et al., 2010a). Не случайно в химически загрязненных почвах наблюдается феномен цианофитизации альго-цианобактериальных комплек-

сов (Горленко и др., 2006; Кабиров и др., 2010; Евдокимова и др., 2010; Домрачева и др., 2012; Ашихмина и др., 2010; Кондакова, 2012). Кроме того, ЦБ зарекомендовали себя как удобные и эффективные тест-объекты для изучения степени токсичности ОС.

Цель работы – оценить действие ионов меди и никеля на физиологическую активность, сорбционные способности и структурные особенности почвенных сообществ.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние ионов меди и никеля на физиолого-биохимические показатели почвенных цианобактерий.
2. Выявить уровни сорбционной способности альгологически чистых видов почвенных цианобактерий и природных цианобактериальных биопленок.
3. Оценить влияние возрастающих концентраций меди на альгоцианобактериальные сообщества почвы.
4. Определить роль цианобактериальной инокуляции семян растений при выращивании сельскохозяйственных культур в медьзагрязненной почве и оценить биоремедиационный потенциал почвенных цианобактерий.

Научная новизна работы. Впервые для оценки влияния возрастающих концентраций ионов меди и никеля на функционирование почвенных ЦБ и цианобактериальных сообществ использован комплексный подход на основании определения различных физиолого-биохимических показателей, отражающих состояние клеток. Показано, что под действием ионов меди и никеля в клетках почвенных цианобактерий снижаются интенсивность биохемилюминесценции (БХЛ), дегидрогеназная и каталазная активности, концентрация хлорофилла *a*; возрастают концентрации феофитина и малонового диальдегида (МДА) – продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Установлен высокий уровень сорбционной активности по отношению к ионам меди и никеля у альгологически чистой культуры почвенной цианобактерии *Nostoc linckia* (до 60 %) и природных биопленок с домини-

рованием цианобактерий р. *Phormidium* (до 99 % из растворов с ионами меди и до 96 % из растворов со смесью ионов).

Выявлена способность природных биопленок с доминированием *Nostoc commune* к сорбции тяжелых металлов из почв загрязненных экотопов и растворов, содержащих ионы меди и никеля (до 98 %). Впервые доказана возможность самовосстановления механически разрушенных природных сообществ *N. commune* с формированием исходного состава фототрофных микроорганизмов, что свидетельствует о высокой степени консортивных связей в данном сообществе.

Показано, что под влиянием возрастающих концентраций меди в дерново-подзолистой почве происходят структурные изменения, связанные с существенным усилением доли цианобактерий в фототрофных сообществах (до 80 %) и с абсолютным доминированием их безгетероцистных форм.

Установлено, что предпосевная цианобактериальная инокуляция семян пшеницы и гороха цианобактерией *N. linckia* обладает защитным действием для растений при их выращивании в медьзагрязненной почве, снижая уровень накопления ионов меди в надземной части растений до 20 % у пшеницы и до 73,3 % у гороха.

Доказано, что обработка семян горчицы белой культурами почвенных цианобактерий *N. linckia* и *Fischerella muscicola* приводит к стимуляции извлечения ионов меди из почвы и накоплению их в семенах и вегетативной массе растения (до 24,6 % и 52,6 % по отношению к контролю, соответственно).

Практическая значимость работы. Результаты проведенных исследований могут быть использованы для совершенствования системы биомониторинга окружающей среды на основе особенностей функционирования клеток почвенных цианобактерий. Усовершенствована методика тестирования степени токсичности среды по дегидрогеназной активности клеток почвенных цианобактерий с использованием метода количественного определения формазана. Природные цианобактериальные биопленки с доми-

нированием цианобактерий р. *Phormidium* используются для очистки водных растворов от ионов меди (получен патент на изобретение № 2501745 «Способ очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди»). Растительно-цианобактериальный комплекс «горчица белая + *Fischerella muscicola*» можно рекомендовать для очистки почвы от меди.

Личное участие автора. Автор принимал активное участие на всех этапах подготовки диссертационной работы: сборе и обобщении литературных источников по теме исследования, планировании экспериментов, разработке отдельных опытов, выполнении химических, микробиологических, альгологических анализов и обработке полученных результатов.

Апробация. Результаты исследований докладывались на 20 российских конференциях (Москва, Пущино, Уфа, Пермь, Киров, Сыктывкар, Чебоксары), в том числе на двух пленарных заседаниях (II Всероссийская с международным участием научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых (г. Уфа, 2012); Всероссийская научная конференция «Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем» (г. Киров, 2014). Работа была представлена на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерств сельского хозяйства РФ (Номинация для аспирантов и молодых ученых - «Биологические науки») (1 место) и на II Международном молодежном дистанционном конкурсе - конференции «Современные аспекты изучения экологии растений» (г. Уфа, 2014) (1 место).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 45 работ, из них 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК. Получен патент на изобретение №2501745 «Способ очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди». Заявка №2012109029. Приоритет изобретения 11 марта 2012 года. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 20 декабря 2013 г.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за неоценимую помощь и поддержку научному руководителю д.б.н., проф. Л.И. Домрачевой. Особую благодарность выражаю д.т.н., проф. Т. Я. Ашихминой за возможность проведения диссертационных исследований на базе экоаналитической лаборатории ВятГГУ. Отдельная благодарность – А.И. Фокиной, С.Ю. Огородниковой, Л.В. Кондаковой, Г.И. Березину, С.С. Злобину, А.Л. Ковиной, Л.В. Трефиловой, А.А. Калинин, сотрудникам и аспирантам кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА и сотрудникам экоаналитической лаборатории ВятГГУ за оказанную помощь в работе, а также всем коллегам и соавторам публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 189 страницах, включает 45 рисунков и 51 таблицу. Список литературы включает 258 наименований, в том числе 69 зарубежных источников.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК И МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

ТМ, как и другие химические загрязнители, попадают в среду обитания человека в результате не только природных процессов, но и, главным образом, вследствие активной производственной деятельности человека. Они играют важную роль в обменных процессах организмов. В высоких концентрациях ТМ вызывают загрязнение почв, вредно воздействуя на экосистемы. ТМ претерпевают в почве химические превращения, в ходе которых их токсичность изменяется в очень широких пределах. Наибольшую опасность представляют подвижные формы ТМ, т.е. наиболее доступные для живых организмов.

К группе ТМ относят химические элементы периодической системы Д.И. Менделеева с атомными массами свыше 40 атомных единиц: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Hg, Pb, Bi и др. ("ГОСТ Р 17.4.3.07-2001. Охрана природы. Почвы. Требования к свойствам осадков сточных вод при использовании их в качестве удобрений"). Они обладают высокой токсичностью для живых организмов в относительно низких концентрациях, а также высокой способностью к биоаккумуляции.

Опасность, которую причиняют ТМ, усугубляется слабым выведением их почвы. Например, период полуудаления в почвенных условиях для Zn – 70-150, Cd – 13-1100, Cu – 310 – 1500, Pb – 740 – 5900 лет. Токсичность ТМ увеличивается по мере увеличения атомной массы и может проявляться по-разному. Токсичное действие ТМ может быть прямым и косвенным. В первом случае блокируются реакции с участием ферментов, что приводит к уменьшению или к прекращению их каталитического действия. Косвенное воздействие проявляется в переводе питательных веществ в недоступное состояние и создание «голодной» среды (Черников и др., 2000).

В ОС токсичное действие ТМ зачастую с трудом поддается объяснению, поскольку на токсичность могут влиять температура, интенсивность

освещения, влажность и т.д. Перечисленные факторы могут видоизменять (ослаблять или усиливать) реакцию МО, в частности, водорослей и ЦБ на их действие (Заварзин, Колотилова, 2001; Schmidt et al., 2010; Vogel et al, 2010). Так, например, при исследовании токсического действия на ЦБ *Synechocystis sp.* PCC 6803 соли серебра понижение температуры с 23°C до 15°C при освещении 2200 лк увеличивало токсический эффект соли серебра в 1,4 раза по сравнению с оптимальными условиями. Совместное воздействие неблагоприятных условий культивирования (500 лк, 15°C) почти в 4 раза усиливало токсичность данного металла (Богачева, 2011).

МО по-разному реагируют на ТМ в зависимости от вида МО и концентрации ТМ в среде. Всем микробам в качестве компонентов питания необходимы такие элементы, как Co, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, V и Ni. Все эти ТМ должны присутствовать в питательной среде лишь в очень низких концентрациях, обычно порядка нескольких мкг/л. Так, Ni служит кофактором для растительного фермента уреазы, а также стабилизирует структуры ДНК, РНК и рибосомы (Бингам, 1993). Такой металл, как Cu, участвует в метаболизме фенольных соединений, содержится в окислительно-восстановительных системах хлоропластов. Но любой из ионов металлов в достаточно высоких концентрациях становятся токсичными для МО. Токсический эффект Ni заключается в блокировании ферментов и реакций с нуклеиновыми кислотами, а Cu оказывает вредное воздействие в основном на клеточную стенку (Гайсина и др., 2008; Бачура, Храмченкова, 2012).

Таким образом, проявления токсичности могут быть различными, вызывая изменение морфологии, клеточного метаболизма или гибель клеток.

1.1. Изменение анатомо-морфологических показателей микроорганизмов

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в экстремальных условиях одним из регулирующих механизмов, способствующих выживанию организмов, является адаптация. Так, на начальных стадиях

формирования популяции микроводорослей и ЦБ, когда каждая клетка выживает в одиночку, адаптация к токсическим действиям направлена на то, чтобы за счет фенотипических механизмов адаптации обеспечить устойчивость отдельных особей (Гапочка, 1999).

Изменение функционирования клеток при стрессе, вызванном воздействием ТМ, ведет к появлению морфологических аномалий МО, что часто выражается в изменении их формы и размеров (Левин и др., 1989; Савельев, Селях, 2000). Так, при культивировании *Escherichia coli* на средах в присутствии высоких концентраций ТМ ее клетки приобретают несвойственные нитевидные формы. В большинстве случаев эти нарушения связаны с разобщением процессов роста и деления клеток (Багаева, 2013). У ацидофильных гетеротрофных бактерий *Acidophilium symbioticum* было отмечено максимальное изменение в размерах, когда бактерии подвергали субъингибирующим концентрациям Cu и Cd (до 12,5 mM CuSO₄ и до 500mM CdSO₄) (Chakravarty, Banerjee, 2008). Формировались цепи коккоидальной формы с линзовидными сужениями на стыках между клетками в присутствии Cd. При постепенном увеличении концентрации Cd снижалось отношение площади поверхности к объему, в результате чего клетки становились более удлинёнными. В Ni-стрессовых условиях происходила агрегация клеток (концентрация до 25 mM NiSO₄), но, как и в случае с Cd, при увеличении концентрации Ni значительно снижалось отношение площади поверхности к объему. Под действием меди клетки становились округлой либо удлинённой формы. Меньшие морфологические нарушения наблюдались при воздействии Zn (до 100 mM ZnSO₄) – форма бактерий, в целом, сохранялась, углубления на поверхности клеток практически отсутствовали. При воздействии ТМ были обнаружены делящиеся клетки. Таким образом, морфологический анализ показал, что *A. symbioticum* H8 обходит токсическое воздействие ТМ за счет уменьшения площади поверхности клетки к объему ячейки через изменение клеточной структуры. Так, в присутствии Cd наблюдалось максимальное уве-

личение объема клеток, а воздействие Cu уменьшало их объем до минимума. Аналогичным защитным механизмом обладает и бактериальный штамм *Acidocella sp.* (Chakravarty et al., 2007). Другими авторами также было показано, что уменьшение клеточной поверхности относительно объема клеток играет ключевую роль в последующем снижении токсических воздействий за счет уменьшения открытой поверхности клетки для прикрепления поллютанта (Neumann et al., 2005).

При воздействии различных соединений Pb (оксида (II), ацетата, нитрата, сульфата) в концентрациях 100, 500 и 1000 мг/кг почвы на альгоцианобактериальное сообщество серой лесной почвы замечены морфологические изменения водорослей – изменение окраски, формы, присутствие старых и отмирающих клеток. Так, через 1 месяц в опытах была отмечена вакуолизация *Chlamydomonas sp.* при добавлении максимальной концентрации ацетата Pb, у *Protosiphon botryoides* – образование гипноспор и лизис клеток (Темралеева, Пинский, 2012).

Увеличение размера клетки наблюдается и у фототрофных бактерий после воздействия металлоидных оксианионов, таких как хроматы, селенаты, арсенаты (Neppl et al., 1999). Была изучена реакция ЦБ *Spirulina platensis*-S5 к действию Pb, Cu, Zn в концентрациях 0,05; 0,10; 0,15 и 0,20 мг/дм³. Степень токсичности увеличивалась с увеличением концентрации ТМ. Обнаружено пожелтение и фрагментация нитей, а также уменьшение числа спиралей (Choudhary et al., 2007). Наибольшее воздействие металлы оказывали на длину вегетативных клеток, гетероцист, длину и ширину акинет ЦБ *Cylindrospermum michailovskoense*. В целом, по степени влияния на морфометрические характеристики и выживаемость как вегетативных клеток, так гетероцист и спор, ТМ можно расположить в следующей последовательности: Cd>Cu>Pb>Ni>Mn (Зарипова, 2009).

Интересная реакция ЦБ *Nostoc paludosum*, *N. linckia* и *N. muscorum* прослеживается на действие Pb в виде ацетата и Cu в виде сульфата в концентрации 15 мг/кг. Действие Cu вызвало полную гибель всех 3-х видов

ЦБ, однако, микроскопирование показало, что под влиянием Cu сохраняются структурные особенности нитей и клеток, форма, их размеры, т.е. происходит своеобразная «мумификация» клеток (Огородникова и др., 2010).

Замечена чувствительность ЦБ *Synechocystis aquatilis* к сульфату Zn с концентрацией 0,001-0,05 мг/дм³. Частота патоморфологических отклонений клеток возрастала с увеличением концентрации ТМ. При действии ионов Zn (0,03 мг/дм³) в клетке происходили заметные изменения в ее ультраструктуре, что выражалось в агглютинации тилакоидов и формировании скоплений фикобилисом. Также на внешней стороне клетки образовывались электронно-плотные отложения (Волошко, Гаврилова, 1992). В присутствии солей ТМ (AgNO₃; 3CdSO₄·8H₂O; Hg(CH₃COO)₂; CuSO₄·5H₂O) у *Synechocystis sp.* РСС обнаружено, что данный штамм в нетипичных условиях способен формировать многоклеточные агрегаты и цепочки, содержащие до 10 клеток. Произошло утолщение клеточной стенки, был зарегистрирован плазмолиз, поскольку местами пептидогликановый слой утолщался и становился менее электронноплотным, в результате чего происходило отслоение клеточной стенки от протопласта (Богачева, 2011).

Деструктивное действие Рb на морфологическом уровне для *N. commune* проявляется в сокращении числа трихомов, в более активном продуцировании клетками рыхлой слизи. Чехлы ЦБ становятся толстыми с неровными краями (Домрачева и др., 2007).

Учет численности клеток *Scenedesmus obliquus* и биомассы *N. linckia* показал, что степень угнетения альгокультуры возрастала с увеличением концентрации токсиканта – катионов Cd в культуральной среде. Токсикант не оказывал летального действия, но, начиная с 3 суток, размеры клеток *Scenedesmus* в опыте стали больше, чем в контроле. Авторы предполагают, что это связано с тем, что аплантоспоры, образующиеся в клетках, не выходят из материнской оболочки, которая служит защитой от ТМ. Носток стал образовывать большое число спорообразующих клеток, которые были

значительно крупнее. При концентрации токсиканта 10 мг/дм^3 размеры клеток ЦБ отличались от контроля на протяжении всего времени эксперимента, хотя при других концентрациях размеры изменялись, но на непродолжительные моменты (Рублева и др., 2002).

Э.А. Штиной (Штина, Андропова, 1983; Штина и др., 1985; Штина, Евдокимова, 1986; Штина, 1987, 1990) проведены наблюдения за тератологическими изменениями ЦБ и водорослей под действием Cu и Ni. Основные изменения были следующие: 1) изменение окраски ЦБ на светло-желтую и полное обесцвечивание зеленых водорослей; 2) измельчение клеток; 3) интенсивное развитие слизи у ЦБ; 4) лизис клеток при высоких концентрациях ТМ, причем клеточные оболочки зеленых водорослей сохраняются очень долго; 5) образование газовых вакуолей у ЦБ.

При исследовании действия бихромата калия в концентрациях до 10 мг/дм^3 на лабораторную культуру микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* отмечалось укрупнение средних размеров клеток, причем увеличение пропорционально повышению концентрации поллютанта в среде (Артюхова и др., 1996). При изучении влияния хлоридов Cu, Ni и Mn на морфологию водоросли *Xanthonema exile* установлено, что ряд токсичности изученных металлов следующий: $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Mn}$. Все ТМ вызывали уменьшение длины нитей. Cu в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-2} моль/л вызывала полное разрушение клеток, а при концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-6} моль/л была замечена гранулированность цитоплазмы, причем при увеличении концентрации – увеличивалось число гранулированных клеток микроводоросли. Так, число клеток возрастало на 40-50% при концентрации Cu 10^{-6} моль/л. Замечено, что при внесении ТМ прослеживалось увеличение длины клеток. Происходило изменение длины нитей и ширины клеток с увеличением концентрации ТМ (Гайсина и др., 2008). Такая же реакция на действие сульфата Cu была и у морских водорослей *Platymonas arnoldii* и *Cladophora vagabunda* (Ткаченко, Кирсанова, 1986).

При этом некоторые авторы предполагают, что одноклеточные зеленые водоросли как в наземных, так и в водных экосистемах более устойчивы к воздействию ТМ, чем ЦБ (Carr et al., 2005; Duong et al., 2008).

Очевидно, изменения в морфологии является одной из стратегий для выживания МО при таких экологических стрессах, как действие ТМ.

1.2. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимические показатели микробных клеток

Благодаря своей необычайно высокой скорости размножения и метаболическому разнообразию, МО обладают ярко выраженной адаптационной способностью к изменяющимся условиям среды (Franklin et al., 2002). МО приобретают устойчивость к ТМ в результате мутаций или физиологической адаптации. Так, при постепенном нарастании концентрации ТМ может происходить физиологическая адаптация, связанная с исключением из метаболизма клетки звена, чувствительного к данному металлу, или с изменением проницаемости клеточной оболочки (Авакян, 1973; Евдокимова, 1995, 2014). Но адаптация МО возможна до определенных пределов, после которых снижаются их рост и активность. При экстремальных условиях МО приходится тратить почти всю метаболическую энергию для преодоления стресса.

ТМ могут нарушать проницаемость клеточных мембран, взаимодействуя с функциональными группами и аминокислотными остатками белков наружных оболочек МО (Костяев, 1980). ТМ являются ингибиторами клеточного деления. Реагируют с биохимическими активными группами (сульфгидрильными, аминными, карбоксильными). Так, в случае присутствия металлов в виде гидратированных катионов происходит их сорбция на отрицательно заряженной клеточной поверхности МО, что может привести к взаимодействию катионов с доступными ионизированными карбоксильными, фосфатными, амино- и сульфгидрильными группами наружных мембран микробных клеток, при этом возможно протекание окисли-

тельно-восстановительных реакций и реакций комплексообразования. Также ТМ могут вступать в конкурирующее взаимодействие с биоэлементами, в частности, кальцием, магнием и железом, что оказывает повреждающее действие. Происходит замедление и извращение хода обменных процессов клетки, вызывая ответные реакции МО, что приводит к конформационным изменениям белков (Авакян, 1973; Школьник, 1974; Хасанова, 1996).

Проникая внутрь клетки, ТМ коагулируют белки, чем могут вызвать гибель клетки, поражая ферменты дыхания. Данный эффект часто наблюдается при более высоких концентрациях ТМ (10^{-4} – 10^{-3} М). Считается, что подавление дыхания связано в основном с ингибированием транспорта субстратов в клетку, либо с прямым взаимодействием ТМ с компонентами дыхательной цепи (Багаева и др., 2013). Например, ионы Cu подавляют дыхание мицелия *Aspergillus niger* (Евдокимова, 1995). Наблюдалось снижение интенсивности дыхания микроводорослей *Dunaliella viridis*, которое зависело от возраста культуры. В большей степени она ингибировалась в 3-х суточном возрасте (Ростама, Малеев, 2012).

Под действием ТМ может происходить ингибирование брожения, подавляться процессы азотификации и фотосинтеза. У фотосинтезирующих МО под действием ТМ уменьшается содержание хлорофилла в клетках (Багаева и др., 2013; Morin et al., 1999). Так, перспективным для биомониторинга ОС является применение методов измерения флуоресценции хлорофилла для выявления действия поллютантов на водоросли за счет способности хлорофилла, находящегося в фотосинтетических мембранах, служить природным датчиком состояния клеток. Была обнаружена связь показателей флуоресценции хлорофилла с характеристиками состояния фотосинтетического аппарата фотосинтезирующих организмов (Antal et al., 2012). В частности, под действием наночастиц Ag у микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* происходило ингибирование фотосинтетической активности. Снижалась скорость развития культуры МО и существенно

уменьшались параметры флуоресценции хлорофилла, отражающие первичные процессы запасаения световой энергии в фотосинтезе (Заядан и др., 2012). Воздействие ионов Cu на ЦБ *Synechocystis aquatilis* приводило к уменьшению активности фотосинтеза (Хасанова, 1996).

При воздействии различных соединений Pb (нитрата, сульфата, оксида (II), ацетата) в концентрациях 100, 500 и 1000 мг/кг почвы на альгоцианобактериальное сообщество серой лесной почвы замечены изменения в содержании хлорофилла *a*. Так, после 1 месяца экспозиции нитрат Pb вызывал значимое увеличение концентрации хлорофилла *a*, ацетат, наоборот, угнетал содержание пигмента. Внесение нерастворимых форм ТМ, а также более длительное культивирование во всех экспериментах выявило, что данный показатель находился на уровне контроля (Темралеева, Пинский, 2012).

Действие ТМ на МО проявлялось в изменении численности (Заядан и др., 2012) и качественного состава микробоценоза, в изменчивости и адаптации к ТМ их компонентов, а также нарушении биохимических процессов, осуществляемых микробиотой (Евдокимова, 1995, 2014). Действие ионов Cu на *Synechocystis aquatilis* приводило к измельчению клеток, нарушению барьера проницаемости, следствием которого являлось повышенное поступление ионов Ca в поврежденные клетки, замедление скорости роста МО (Хасанова, 1996). ТМ могут вызывать и другие нарушения в ультраструктуре клеток: появление различных включений, дополнительных глобул липидов, образование митохондрий неправильной формы, уменьшение числа рибосом и другие. ТМ ингибируют и биосинтетические процессы, в результате которых наблюдаются изменения в содержании основных полимеров в клетках. Наиболее общим эффектом является ингибирование синтеза белка и РНК. Происходит мутагенное воздействие на МО, которое вызывает увеличение частоты мутаций, хромосомные aberrации и другие нарушения ДНК. Таким

образом, ТМ оказывают токсическое действие на большинство участков метаболических путей МО (Багаева и др., 2013).

Для представителей ряда бактерий и дрожжей при загрязнении ОС ТМ показано изменение работы ферментных систем, нарушение проницаемости мембран в клетках МО (Левин и др., 1989). Показано, что ТМ замедляют скорость деления дрожжей и бактерий (Авакян, 1973).

Довольно общей чертой действия высоких концентраций ТМ на бактерии *Rhodopseudomonas capsulata* является замедление начала роста. При воздействии ацетата метилртути была отмечена более долгая лаг-фаза культуры. Воздействие Cd расширило лаг-фазу кишечной палочки, при этом 95 % клеток теряли жизнеспособность. Во время данной фазы роста при воздействии хлорида Hg также наблюдалось снижение жизнеспособности *Rhod. capsulata*, хотя мутность жидкости оставалась прежней (Sterritt, Lester, 1979).

Установлено проявление токсического воздействия ТМ на микроскопические грибы (Ровбель и др., 2000; Massaccesi et al., 2002; Bhatachacharya et al., 2002; Morin et al., 2006; Терехова, 2007; Vahabi et al., 2008; Куимова и др., 2008; Moore et al., 2008; Киреева и др., 2009). Например, ионы таких ТМ, как Cu, Co, Mo, нарушают морфогенез грибов р. *Fusarium*, ионы Cu и Zn в концентрации более 50 и 100 мкг/дм³ оказывают летальное воздействие на виды р. *Penicillium*. Ионы Cd полностью, а Cu частично подавляют транспорт Zn в мицелии гриба *P. notatum* (Багаева и др., 2013). В то же время, малые количества Cu и Ni в жидкой питательной среде стимулируют рост и развитие некоторых грибов. Cu в концентрации 20 мг/дм³ стимулирует рост *Asp. niger*, *F. moniliforme*, *P. notatum*, а Ni в той же концентрации ускоряет рост *Asp. niger*, *Trichoderma lignorum* (Евдокимова, 1995).

Водоросли в силу своей физиологических особенностей значительно слабее по сравнению с пластичными грибами адаптируются к изменившимся условиям среды (Евдокимова, 1995; Rai et al., 1990; Duong et al.,

2008). В опыте с использованием бихромата К в диапазоне концентраций от 0,9 – 2,5 мг/дм³ за 96 ч наблюдалось достоверное снижение численности *Scenedesmus quadricauda* на 50% (Спиркина, 2012). При изучении влияния ионов Zn на пресноводную ЦБ *Anabaena cylindrica* обнаружено, что при концентрациях 1,0 и 5,0 мг/дм³ активность цитохромоксидазы ЦБ ингибировалась почти на треть сразу после внесения ТМ. В течение 24 ч происходило малозаметное восстановление функциональной активности, а к концу эксперимента наблюдалось постепенное снижение активности цитохромоксидазы (Бондарь, 2012).

Установлено, что внесение Cu в виде сульфата и Pb в виде ацетата в концентрации 5 ПДК в культуры ностоков (*N. paludosum*, *N. linckia* и *N. muscorum*), приводит к возрастанию интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ). Наибольшее накопление продукта ПОЛ – малонового альдегида (МДА), – отмечали в варианте с Cu. При определении активности каталазы (АК) было доказано, что величина этого показателя колеблется в больших пределах у данных видов *Nostoc* под действием ТМ. Так, максимальная АК характерна для *N. paludosum*, а у *N. linckia* она почти в 3 раза ниже при приблизительно таком же количестве жизнеспособных клеток. Постмортальная АК отмечена у всех видов ЦБ при действии Cu и Pb – *N. muscorum* (Огородникова и др., 2010).

Было проведено исследование токсического действия Pb, Cu и Zn в концентрациях 0,05; 0,10; 0,15 и 0,20 мг/дм³ на ЦБ *Spirulina platensis*. Показано, что при сокращении роста ЦБ содержание МДА, супероксиддисмутазы (СОД) и белка пролина увеличивалось при высоких дозах ТМ в культуральной среде (Choudhary et al., 2007). Самое высокое количество МДА было зафиксировано для Cu и Zn. Различия были очень малы для высоких концентраций и высоки для малых концентраций ТМ. Активность СОД возрастала с увеличением концентрации ТМ. Увеличение содержания пролина было прямо пропорционально концентрации ТМ. Биомасса ЦБ снизилась, в то время как накопление пролина увеличивалось с увеличением

концентрации металлов. Вероятно, содержание пролина имеет обратную связь с ростом исследуемого штамма, т.е. происходит снижение клеточного деления или задержка экспоненциального роста за счет накопления пролина. Следовательно, увеличение количества МДА может свидетельствовать об образовании свободных радикалов у ЦБ при больших концентрациях ТМ, а повышение уровня СОД и пролина указывает на возникновение защитного механизма.

Таким образом, действие ТМ на МО проявляется как в адаптации их к ТМ, так и в нарушении биохимических процессов, осуществляемых МО.

1.3. Механизмы микробиологической детоксикации тяжелых металлов

Способность МО противостоять токсическому действию ТМ предполагает в своей основе различные механизмы детоксикации. Анализ литературных источников по изучению устойчивости МО к действию ТМ позволяет выделить следующие механизмы адаптации: 1. Внеклеточное связывание ТМ: экстрацеллюлярными полимер-металл-взаимодействиями; экстрацеллюлярной иммобилизацией ТМ метаболитами; металл-сидерофорными взаимодействиями; 2. Связывание ТМ клеточной стенкой; 3. Внутриклеточная аккумуляция; 4. Трансформация ТМ; 5. Регуляция устойчивости на генетическом уровне.

Рассмотрим более подробно каждый из них.

Внеклеточное связывание ТМ

Значительное выделение экзометаболических веществ – явление, характерное для большинства МО. Среди выделяемых веществ обнаружены различные классы органических соединений: сахара и полисахариды, органические кислоты, амиды, аминокислоты, липиды, их производные, изотерпеноиды, углеводороды, фенолы (Сакевич, 1985; Сиренко, Козицкая, 1988; Андреюк и др., 1990; Бекасова и др., 2002; Лябушева, 2004; Орлеанский и др., 2005; Фокина и др., 2012). По механизму действия данные соединения делят на несколько групп: протекторы (стабилизаторы); вещества сигнальной при-

роды, являющиеся индукторами защитных механизмов клетки; регуляторы – неиндукторы (например, регуляторы адгезии); «противоядия» и нейтрализующего действия (Николаев, 2004).

Многие МО синтезируют внеклеточные полисахариды, которые активно связывают ТМ. Именно экзополисахаридам приписывают большую роль в детоксикации (Шнюкова, 2005; Parker et al., 2000; Quintelas et al., 2002). Например, у ЦБ возможна дистанционная детоксикация, при которой система защиты ЦБ от ТМ включает связывание экзополисахаридами в культуральной среде (Бекасова и др., 1999). Различные ЦБ обладают разной сорбционной способностью. Так, обнаружено, что поглощение Pb из жидкой среды составляет у *N. paludosum* около 80%, у *N. muscorum* – 91,3% от изначальной концентрации (Фокина, 2008). Кроме того, ЦБ адаптируются к неблагоприятным внешним воздействиям с помощью интенсивного выделения внеклеточной слизи. Доля этих веществ в общем балансе может достигать 30% связываемого за 24 ч углерода или 40% чистой 24-часовой продукции фотосинтеза (Fogg et al., 1965). Чем большее количество слизи выделяется, тем полнее связываются поллютанты из раствора. У сапротрофных МО слизистые капсулы могут намного превосходить размер самой клетки (Гусев, Минеева, 2003).

Другой путь внеклеточной детоксикации □ это экстрацеллюлярная иммобилизация ТМ метаболитами бактерий (Al-Schadwani et al., 1984). В этом процессе могут изменяться как физиологические, так и морфологические признаки. Процесс также влияет на ферментативную активность, скорость размножения, интенсивность биохимических процессов, может улучшать свойства МО, как сорбентов (Белясова, 2002). Показано, что Cd не проникает внутрь микробной клетки, чтобы связаться с жизненно важным белком, он застревает в ее слизистой оболочке, откуда берет S для создания сульфида Cd, который не растворяется в воде. В оболочке клетки скапливаются и кристаллы чистого Cd, который образуется внутри кри-

сталлов сульфида Cd под воздействием солнечного света (Lafon-Lafourcade, 1984).

Попадание ТМ в клетку может быть предотвращено и путем образования комплексов или хелатов с несколькими металл-связывающими агентами (Sterritt, Lester, 1979). Это металл-сидерофорные взаимодействия. Сидерофоры – это хелатирующие агенты, выделяемые многими МО и способствующие поглощению катионов Fe. Но они могут реагировать и с другими ТМ (Leland et al., 1979; Canizares-Villanueva, 2000), и даже токсичный ион арсената может проникнуть в клетку путем активного транспорта, как в случае *Saccharomyces cerevisiae* (Эрлих, 1981).

Связывание металлов клеточной стенкой

Компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий являются эффективными хелатирующими агентами в отношении многих ТМ. Это пептидогликан муреин, тейхуроновые и тейхоевые кислоты, экзоцеллюлярные полисахариды. А у грамотрицательных МО наружная мембрана избирательно пропускает ионы ТМ в периплазматическое пространство клетки, где они связываются с пептидогликаном (Обзор: Фокина и др., 2008).

Процесс адсорбции ТМ на поверхности МО включает связывание его с клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной, а также с веществами капсул и внеклеточных выделений. Взаимодействие связано с отрицательным зарядом этих поверхностных структур (Багаева и др., 2013). Основными активными связывающими группами клеточной стенки являются: амино-, карбоксильная, сульфгидрильная и сульфатная группы (Чубуков, 1982; Гайсина, 2008; Friedberg, 1977; Raize et al., 2004).

Интересны данные, получены при выращивании *Bacillus subtilis* в растворе хлористого золота. Выяснилось, что на ее стенках образуются микрокристаллы чистого металлического золота. Накопление металла происходит в два этапа. Сначала катионы Au^{3+} , находящиеся в растворе, взаимодействуют с отрицательно заряженными группами макромолекул, вхо-

дящих в состав клеточной стенки бактерии. На возникающих ядрах кристаллизации быстро осаждается металл из раствора. Кроме золота, *B. subtilis* может извлекать из раствора около 40 ТМ (Чубуков, 1982).

Участками связывания ТМ в клеточной стенке могут быть молекулы белков (Hg – у дрожжей), карбоксильные группы пептидогликанов (двухвалентные катионы – у бацилл), фосфатные группы (U – у дрожжей). Распределение аккумулированных ТМ зависит от вида МО и ТМ. Так, Hg, Cd, Ag, U сорбируются в основном бактериями и грибами на поверхности клеток, лишь частично проникая внутрь (Багаева, 2013).

Была показана способность бурой водоросли *Sargassum vulgare* сорбировать ТМ компонентами клеточных стенок (Raize et al., 2004), а зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* способна адсорбировать Cd (Taylor et al., 1989; Slaveyukova, Wilkinson, 2002). Pb в виде фосфата адсорбируется у *Citrobacter sp.* на поверхности клеток (Багаева, 2013).

В анаэробных условиях *Clostridium spp.* способен стабилизировать ионы Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Ni в неактивном состоянии с помощью экзополисахаридов клеточной стенки (Обзор: Фокина и др., 2008).

Мертвые клетки *Saccharomyces cerevisiae* удаляют примерно на 40% больше U и Zn, чем соответствующие живые культуры. Биосорбция урана *S. cerevisiae* – это быстрый процесс. Его отложения отличаются от других ТМ большей степенью связывания именно с клеточной стенкой, а U скапливался в виде мелких игольчатых кристаллов как внутри, так и снаружи клетки *S. cerevisiae* (Volesky, May-Phillips, 1995).

У микромицетов четко наблюдается взаимосвязь между уровнем загрязнения почвы и количеством грибов, содержащих меланиновые пигменты (Домрачева, 2000, 2005; Кулько, 2001; Терехова, 2007; Домрачева и др., 2013). Выжить грибам в экстремальных условиях помогает более совершенный энергетический обмен, чем у бактерий (Евдокимова, 1995, 2014). Некоторые микроскопические грибы сорбируют ТМ преимущественно клеточной стенкой (Bhattachacharya et al., 2002; Das et al., 2009). Такие

компонеты клеточной стенки, как органические кислоты, меланиноподобные пигменты, пептиды и полисахариды (глюканы и маннаны), жирные кислоты, хитин являются потенциальными агентами биосорбции.

Внутриклеточная аккумуляция ТМ

Концентрация ТМ внутри бактерий зависит от пассивного транспорта в клетку и его взаимодействия с поверхностными лигандами (Aickin, Dean, 1979). Но чаще всего проникновение ионов ТМ внутрь клеток МО происходит по механизму активного транспорта посредством транспортных белков-переносчиков, в частности, систем унипорта катионов К (May-Phillips, 1995, Хасанова, 1996; Volesky). У бактерий и грибов этой системой является система транспорта Mg, а иногда Ca и Mn.

Процесс аккумуляции ТМ во времени может протекать по-разному. Так, одних случаях его скорость составляет секунды с момента контакта клеток с ТМ, в других растягивается до нескольких часов.

МО аккумулируют ТМ в больших количествах, чем это нужно для их нормальной жизнедеятельности. Могут накапливаться и ТМ, которые совсем не участвуют в метаболизме. Например, Cd у *E. coli* может накапливать Cd до 90 мг/1 г сухой биомассы (Чурикова, Викторов, 1994). У *Azotobacter sp.* и *Micrococcus luteus* содержание Pb достигало $3,1-4,9 \cdot 10^2$ мг/г сухой биомассы (Багаева, 2013).

Связывание ТМ может быть специфическим, характерным для некоторых ЦБ, водорослей и грибов, а также неспецифическим. Специфичность связывания определяется наличием низкомолекулярных, богатых цистеином специализированных белков, связывающих большие количества ТМ. У бактерий, за исключением ЦБ, подобные белки не обнаружены, но аналогичные функции могут выполнять другие высокомолекулярные белки (Багаева, 2013).

При культивировании *Synechocystis sp.* и *Synechocystis sp. sp.* в среде с солями Cd, Cu, Hg и Ag выявлялись изменения как в цитоплазме, так и в нуклеоиде. А в первой исследуемой ЦБ наблюдалось и разрушение рибосом.

Эти внутриклеточные структуры являются полифосфатными телами, которые выполняют роль в связывании ТМ (Богачева, 2011). Эти данные подтверждают и другие исследования (Савельева, 2000; Jensen et al., 1982; Rai et al., 1990), которые как раз и выявили накопление полифосфатных гранул у ЦБ *A. flos-aquae*, *A. variabilis*, *Nostoc* sp. и *Plectonema boryanum* в ответ на воздействие ионов Zn и Cd.

В растворимой фракции ЦБ *Synechocystis aquatilis* были обнаружены шоковые белки, которых не было в контрольных вариантах. Данный факт рассматривают как защитный механизм к действию ТМ, поскольку после токсического шока клетки приобретали устойчивость к действию ионов Cu (Хасанова, 1996).

ТМ могут накапливаться в вакуолях, где связываются с полифосфатами, превращаясь в нетоксические комплексы. Таким образом, может быть накоплено большее количество ТМ, чем биосорбцией клеточными стенками, хотя последний процесс более быстрый (Евдокимова, Мозгова, 1975; Левин и др., 1989; Гузев и др., 2001; Савич и др., 2003; Самохвалова, Фатеев, 2006).

Исследование ЦБ *A. cylindrical* при внесении в культуральную среду Zn, Pb, Mn, Cu показало, что через 15 суток распределение ТМ в клетке определяется химическими градинами и сродных к ним субклеточных лигандов, особенно белков. Так, биогенные ионы накапливаются преимущественно в хлоропластах и митохондриях, небιοгенные связываются с белками эндоплазматической сети (Грубинко, 2012).

Некоторые МО для защиты от минеральной недостаточности вырабатывают специальные хелатообразующие вещества, облегчающие проникновение необходимых микроэлементов (например, Fe) в клетку (Николаев, Стрелко, 1979).

Изучение функций глутатиона, открытого еще в конце XIX века, продолжает привлекать внимание многих исследователей (Struznka et al., 2005; Schroder et al., 2008). Глутатион называют самым мощным природ-

ным антиоксидантом, лучшим средством клеточной защиты и одним из гарантов здоровья индивида (Смирнова, 2005). Фактически глутатион не только защищает клетку от таких токсичных агентов, как свободные радикалы, но и в целом определяет редокс-статус внутриклеточной среды (Stružnka et al., 2005). Отношение восстановленный/окисленный глутатион внутри клетки является одним из важнейших параметров, который показывает уровень внутриклеточной токсичности, может изменяться в зависимости от преобладания тех или иных реакций, что, в свою очередь, определяется состоянием клетки в ОС (уровень окислительного стресса) (Kosower, Kosower, 1978; Shelley, Jasvinder, 2002). Глутатион эффективно взаимодействует с ионами металлов переменной валентности, защищая клетки от токсичного действия ионов ТМ. Опыты по изучению содержания глутатиона в клетках ЦБ показали, что в исследуемой культуре данный показатель помогает оценить возможность его применения для почвы и воды, загрязненной поллютантами, в том числе и ТМ. Увеличение количества данного пептида говорило о том, что ЦБ способны противостоять неблагоприятным условиям, которое обеспечивается связыванием с глутатионом. Данная реакция соответственно приводит к снижению токсичности объекта (Лялина, Гудина, 2013). Доказано, что при стрессовых условиях изменения содержания глутатиона и других низкомолекулярных тиолов в экстраклеточном пространстве настолько значительны, что могут существенно влиять на редокс-потенциал МО. Как правило, воздействия факторов стресса вызывают заметные изменения содержания внеклеточного глутатиона (Смирнова, 2005). При добавлении ртути в среду усиливается секреция глутатиона *E. coli*, который, в свою очередь, уменьшает токсический эффект, наносимый металлом (Sterritt, Lester, 1980). Таким образом, доказано, что глутатион – средство клеточной защиты.

Трансформация металлов

Метилирование ТМ является еще одним вариантом в решении экологической проблемы загрязнения ОС. Изучена способность МО к метилиро-

ванию и этилированию таких ТМ как Hg, As, Se, Te (Avery et al., 1993). Значительной способностью переводить металлы в летучую форму обладают бактерии pp. *Clostridium* и *Pseudomonas* (Багаева и др., 2013).

Регуляция устойчивости на генетическом уровне

Устойчивость микробных культур, чувствительных к ТМ, может развиваться в результате многократных пересевов в присутствии возрастающих концентраций ТМ. В других случаях гены, кодирующие признак устойчивости к ТМ, могут находиться в хромосомах и в плазмидах. Возможна их передача из клетки в клетку с помощью R-плазмид, пенициллиновых плазмид, и транспозонов. Так, устойчивость к антибиотикам у бактерий связана с конкретными детерминантами устойчивости к ТМ (Sterritt, Lester, 1979).

Таким образом, механизмы детоксикации ТМ представителями разных групп МО различны.

1.4. Роль микроорганизмов в биоремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами

Почва – сложнейшая система, одним из функциональных элементов которой являются населяющие ее живые организмы (Добровольский, 2001). При техногенном загрязнении компонентов биосферы почвенная биота выполняет важную функцию – детоксикацию различных соединений, в том числе и ТМ, присутствующих в почве и влияющих на состояние ОС (Черников и др., 2000; Шабаев, 2014). ТМ в высоких концентрациях вызывают загрязнение почв, что, в конечном итоге, приводит к ухудшению экологической обстановки и представляет потенциальную опасность для здоровья человека и животных. В условиях прогрессирующего загрязнения ОС остро встает вопрос о разработке доступных методов биоремедиации подобных почв. Все большую популярность завоевывают приемы биологической очистки, которые включают использование организмов различных систематических групп.

Для эффективной биоочистки экосистем допустимо использование биоты с высокой устойчивостью к воздействию ТМ. Благодаря тому, что МО обладают высокой сорбционной способностью по отношению к ТМ, они способны снизить их токсичность, несмотря на то, что всего 30-50% клеток в популяции могут накапливать ТМ. Вероятно, эффективность аккумуляции зависит от стадии развития культуры. Кроме того, мертвые клетки МО способны аккумулировать ТМ в примерно равных или больших количествах, чем живые клетки (Багаева, 2013).

Особый интерес представляет изучение МО-биоремедиаторов, где действующим началом служат микромицеты, отдельные виды МО и многовидовые сообщества. Использование биосорбентов расширяет возможности защиты экотопов. Безусловно, это направление в биотехнологии ожидает большое будущее. Так, МО, накапливающие ТМ, превосходят химические сорбенты по емкости и специфичности сорбции. Например, с помощью микробов-сорбентов осуществляется сорбция и радиоактивных ТМ. В процессе не требуется предварительная очистка сточных вод от взвешенных частиц и органических примесей, а загрязнители извлекаются быстрее, чем химическим путем (Чубуков, 1982).

Дрожжи родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* могут успешно использоваться в качестве биосорбционного материала для таких ТМ, как Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, U, Th, Zn (Лозовая и др., 2004). Большинство дрожжей может поглощать или широкий спектр ТМ или быть строго специфичны в отношении только одного металла (Podgorskiĭ et al., 2003). Так, доказана способность *S. cerevisiae* к улавливанию Zn, Cu и U из разбавленных водных растворов при pH=4-5 и тенденция к накоплению Pb^{2+} (Volesky, May-Phillips, 1995). Известно, что сорбирование живыми клетками *S. cerevisiae* позволяет значительно снизить концентрацию ТМ в промышленных сточных водах. В случае загрязнения сточных вод Cu дрожжи могут уменьшать концентрацию ТМ до 6 раз. МО *S. cerevisiae* устойчив к присутствию больших концентраций ТМ. Культура сохраняет высокие по-

казатели выживаемости и эффективности поглощения при концентрации сернокислой Cu – до 300 мг/дм^3 . Наибольшие значения сорбирования (от 88,7% до 99,6%) ТМ отмечаются в течение 24 ч при $\text{pH}=5-8$ и количестве биомассы культуры – 10 г/дм^3 (Гаранин, 2011).

Изучена возможность использования *S. bergensis* в очистке сточных вод от Cu^{2+} , Ag^+ , Cr^{3+} в концентрациях 3-60; 40-195; 10 мг/дм^3 соответственно. Дрожжи сорбируют ТМ со способностью очистки от Cu^{2+} за 3-4 ч на 99,8-100 %, Ag^+ за 2-4 ч на 99-100%, Cr^{3+} за 94 ч контакта на 95% (Буракаева и др., 1999).

Рядом авторов было обнаружено, что использованием смеси *Candida lipolytica* и обезвоженного осадка сточных вод приводит к биосорбции Cr из водных растворов и гальванических загрязненных вод. Исходное значение pH , дозировки биосорбента и время контакта – важный параметр Cr - биосорбции (Ye et al., 2010a; Ye et al., 2010b).

Впервые для удаления из водных растворов Cu^{2+} и Cr^{3+} использовали как жизнеспособные, так и нежизнеспособные дрожжи *Pichia stipitis*. Живые клетки *Pichia stipitis* могут расти в присутствии Cu^{2+} и Cr^{3+} и накапливать эти ионы. С другой стороны, нежизнеспособные клетки *P. stipitis* оказались эффективным биосорбентом для Cu^{2+} и Cr^{3+} (Yilmazer, Saracoglu, 2009).

Найден способ извлечения Au из сточных вод ювелирной фабрики – добавление суспензии дрожжей р. *Saccharomyces*, *Candida*, *Rodotorula* и бактерии р. *Escherichia*. Способ эффективный, поскольку позволяет извлекать из водных растворов высокодисперсное Au на 98-99 % (Буракаева и др., 1999).

Во многих случаях физико-химические технологии для удаления ТМ являются дорогими и неэффективными при низких исходных концентрациях ТМ. Потенциал альтернативной биологической очистки в последние десятилетия существенно возрос. Например, использование грибов является перспективным направлением в данной области. Так, в исследованиях,

проведенных учеными из Южной Африки, показано, что Pt и Au практически полностью удаляются фоновой культурой грибного штамма, являющейся наиболее толерантной к ТМ, при концентрации поллютантов 50 мг/дм³ в течение 72 ч. Сорбция Cu максимально эффективна при более низких концентрациях. Доказано, что Ni и Au оказывают токсическое действия на грибы, угнетают их рост (Moore et al., 2008).

Грибы, выделенные из почв с большим содержанием ТМ, способны к их высокой биоаккумуляции, накапливая в своей биомассе от 0,3 до 1,5% Cu и Ni на абсолютно сухую массу (Чубуков, 1982; Евдокимова, 1995). *Rhizopus arrhizus* способен поглощать различные катионы (La^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+}) и анионы металлов. Усвоение молибдат- и ванадат-анионов было сильно рН-зависимым. Выдвинуто предположение, что механизм сорбции включает в себя электростатическое притяжение к положительно заряженным функциональным группам (Tobin et al., 1984). Существуют данные о способности поглощения Zn до 80% из щелочного черного шлака, который содержит 20% металла, микромицетом *Verticillium marquardii* (Singh, Rai, 1990; Slaba, Dlugonski, 2000).

Плесневые микромицеты также обладают сорбционными способностями. Например, одна из плесневых культур фикомицетов удаляет из загрязненной воды U в 3,5 раза быстрее, а Th – в 2,3 раза быстрее, чем ионообменные смолы. Применение способа очистки воды от As с использованием грибов р. *Penicillium* дает возможность извлечь As из раствора концентрацией 512 мг/дм³ на 99,8%. В случае очистки водных растворов от Cr сорбция мицелия *A. flares* при исходной концентрации Cr^{6+} 11,4 мг/дм³ и Cr^{3+} 0,39 мг/дм³ составила 72,8% (Буракаева и др., 1999).

В качестве биосорбента интерес представляют и бактерии, которые являются важными агентами в модификации и детоксикации ТМ. Некоторые устойчивые к ТМ виды могут накапливать ТМ путем их удаления из системы, оказывая защитное действие. Так, *E. coli* в 20 раз более устойчи-

ва к Hg и может накапливать ее в 5 раз больше, чем *Staphylococcus aureus* (Sterritt, Lester, 1980).

В США несколько видов Mn-устойчивых бактерий были использованы для очистки шахтных вод (Шелепаев, Ковалевская, 2013).

Показано, что популяции аноксигенных фототрофных пурпурных несерных бактерий способны расти и сорбировать ионы Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} при повышенных концентрациях ТМ в среде (Антонова, 2006; Галямина и др., 2007).

Доказано, что использование культуры денитрифицирующих бактерий при восьмиминутном контакте с U приводит к снижению концентрации ТМ в водной среде с 25 до 0,5 мг/дм³. В США уже запатентован способ биологической детоксикации Hg-содержащих сточных вод. Используются бактерии р. *Pseudomonas*, которым ввели плазмиды, определяющие синтез белка, способного связывать Hg из ее соединений – как органических, так и неорганических. "Отработавшие" клетки сжигают, а Hg выделяют из продуктов их сгорания (Чубуков, 1982).

Тестирование бактерии ZAN-044 в жидком почвенном экстракте с низкой концентрацией Cd (1 мг/дм³) показало, что уровень биосорбции был максимальным (69%) при pH=7. С другой стороны, бактерии не росли в среде с Cd концентрацией 10 мг/дм³ (Lebeau et al, 2002; Andreoni et al, 2003).

Эффективными МО - биоремедиаторами являются актиномицеты и актинобактерии (Костина и др., 2004). Некоторые устойчивые к ТМ штаммы актиномицетов, выделенные из загрязненных экотопов, способны эффективно извлекать Cd из среды (Zouboulis et al., 2004). Установлена способность актиномицетов R27 к сорбции Cd из сточных вод с низким уровнем загрязнения ТМ. Выявлено, что процент сорбции Cd свободными, не-прикрепленными к субстрату клетками, увеличивается при минимальной концентрации Cd (1 мг/дм³) на 6-42% и на 11-48% при 10 мг/дм³ (Lebeau et al., 2002).

Благодаря высокой чувствительности к изменению состояния почвы водоросли активно используются для оценки направленности почвенных процессов и антропогенных изменений ее свойств (Дорохова, 2012). Сорбционная активность 6 разных водорослей была показана в отношении Cd, Ni, Zn, Cu и Pb в водных растворах. Были изучены оптимальные условия сорбции для каждой монометаллической системы. Оптимальный уровень pH для поглощения Cd, Ni и Zn оказался равен 6, а менее 5 – для Cu и Pb. Оптимальная концентрация биомассы для опыта составила 0,5 г/дм³. По сорбционным качествам для водорослей ТМ можно расположить следующим образом: Pb > Cd = Cu > Zn > Ni. Бурыми водорослями достигнут самый низкий уровень концентрации ТМ в растворе (Romera et al., 2007).

Такие организмы как, *Ecklonia maxima*, могут быть использованы в качестве эффективного биосорбента для очистки сточных вод, содержащих ТМ (Feng, Aldrich, 2004).

Степень поглощения Cr³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ была оценена при различных значениях pH, времени нахождения водорослей в растворе с ТМ, концентрации биомассы водорослей. Скорость поглощения ТМ наиболее интенсивна в течение первых 2 ч, в дальнейшем увеличение поглощения было незначительным. При увеличении биомассы водорослей увеличивается и сорбция ТМ в диапазоне 5-15 мг /дм³ (Hamdy, 2000).

Большой интерес представляют широко распространенные в природе уникальные природные фототрофы – цианобактерии. Это древнейшие организмы, которые могут адаптироваться к экстремальным условиям благодаря своим биохимическим и физиологическим свойствам и возможности аккумулировать и обезвреживать различные поллютанты (Гапочка, 1981, 1999; Андрюк и др., 1990; Патова и др., 2000; Шадрина, 2001; Панкратова, 2001, 2010; Рублева и др., 2002; Ананьева, 2003; Сопрунова, 2006; Домрачева и др., 2006; Ашихмина и др., 2006; Бреховских, 2006; Кадырова и др., 2007; Домрачева и др., 2009; Фокина и др., 2011; Jensen et al., 1982; Rai et al., 1992; Avery et al., 1993; Bergman et al., 1997; Thompson et al., 2002; Vo-

lesky, May-Phillips, 2004; Chadkar et al., 2012). Не случайно в химически загрязненных почвах наблюдается феномен цианофитизации альго-цианобактериальных комплексов (Домрачева, 2012). Имея способностью к фотосинтезу и азотфиксации, они минимально зависимы от уровня сапробности почвы (Домрачева и др., 2013а).

Во многих работах доказана способность ЦБ к накоплению и детоксикации ТМ (Саванина и др., 1999; Саванина и др., 2003; Домрачева и др., 2007). Так, ЦБ *N. linckia* способна аккумулировать из ОС от 36 до 94% ионов Zn, Cu, Sr (Обзор: Домрачева и др., 2006). В одинаковой мере способностью к сорбции обладают не только живые, но и лиофилизированные клетки термофильных ЦБ. Обнаружено, что слизистые цианобактериальные пленки, состоящие в основном из *Phormidium sp.* и *Mastigocladus laminosus* связывали ТМ в таком порядке: Cu>Zn>Pb>Cr (Обзор: Домрачева, 2013а). ЦБ *Gomphosphaeria aponia*, обитающая в Атлантике, откладывает Fe в виде гидроокисей на своей клеточной оболочке (Чубуков, 1982).

Установлено влияние Cr на рост и развитие *Synechococcus* PCC 7942 и *Nostoc* PCC 7120. Показано, что уровень поглощения и токсичность ТМ зависит от его валентности (Thompson et al., 2002). Например, степень поглощения ионов Cr⁶⁺ ЦБ *Spirulina platensis* на два порядка ниже по сравнению с ионами Cr³⁺. При сравнении степени поглощения ионов Fe, Zn, Cu, Sr, а так же анионов Se интактными клетками ЦБ доказано, что наибольшей аккумулирующей способностью обладают ионы Zn и Fe (Мушак, 2006).

Таким образом, в результате многочисленных исследований выявлены группы МО, способных к биоаккумуляции ТМ из ОС, которые можно рассматривать как перспективные объекты для биоремедиации почв, загрязненных ТМ.

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на базе кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии ВГСХА и аттестованной экоаналитической лаборатории ВятГГУ. Образцы почв и грунтов для химико-микробиологического анализа отобраны с территории Кирово-Чепецкого химического комбината (КЧХК), горно-металургического комбината (ГМК) г. Владикавказа, центральной части г. Владикавказа, обочин железной и автодороги г. Дзержинская Нижегородской области. Образцы пахотных почв отобраны с территории учебно-опытного поля Вятской ГСХА, характеристика которых приведена в главе V.

К обсуждению результатов привлечены материалы совместных исследований с коллегами, которые отражены в общих публикациях.

2.1. Цианобактерии и высшие растения, используемые в лабораторных и полевых опытах

Опыты проведены с альгологически чистыми культурами ЦБ (*Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flah. № 271 и *Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. № 300) из коллекции фоторофных микроорганизмов кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА, а также с природными цианобактериальными биопленками (с доминированием гетероцистных ЦБ *Nostoc commune* и безгетероцистных ЦБ рода *Phormidium*).

Nostoc linckia (Roth) Born. et Flah. № 271. Выделение штамма в чистую культуру провела А.Л. Ковина из дерново-подзолистой почвы Учебного хозяйства Вятской ГСХА в 1991 году.

Fischerella muscicola (Thur.) Gom. № 300. Этот вид был выделен в 2010 г. из луговой почвы Оричевского района Кировской области А.Л. Ковиной.

Природные пленки с доминированием ЦБ *Nostoc commune* – многовидовые сообщества фототрофных и сапротрофных микроорганизмов,

способные развиваться в массе на поверхности почвы в различных регионах земного шара, включая местообитания с экстремальными условиями естественного или антропогенного происхождения. Пленки отобраны Л.В. Кондаковой в 2009 г. с поверхности подзолистой песчаной почвы, техногенно преобразованной, вдоль обочины шоссе и железной дорог на окраине г. Дзержинска Нижегородской области, который является одним из экологически неблагоприятных городов России.

Природные биопленки с доминированием безгетероцистных (БГЦ) ЦБ рода *Phormidium* отобраны с поверхности городской почвы промышленной зоны г. Кирова Ю.Н. Зыковой в 2009 г.

В качестве объектов исследования также использовали высшие растения разных семейств, которые тестировали на способность к выносу ТМ из почвы. Горчица белая (*Sinapis alba*) – вид однолетних травянистых растений семейства Капустные (*Brassicaceae*). Однолетнее растение высотой 25 – 100 см. Растения способны усваивать из почвы макро- и микроэлементы, недоступные другим растениям. Горох (*Pisum sativum*) сорта Лучезарный. Оригинатор: ГНУ Фаленская селекционная станция НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого. Горох является характерным представителем семейства бобовых (*Fabaceae*). Включен в Государственный реестр сортов с 1992 года (авторы – Н.В. Калинина, З.И. Вавилова, Л.Д. Дементьева и др.). Пшеница (*Triticum aestivum*) сорта Ирень (Семейство Злаки (*Poaceae*)). Данный сорт выведен в Красноуфимском селекционном центре ГНУ Уральский НИИСХ путем скрещивания сортов Иргина и Красноуфимская 90. Включен, начиная с 1998 г. и по настоящее время, в Госреестр по 1; 2; 3; 4; 9; 10; 11 регионам РФ. Разновидность Мильтурум.

2.2. Характеристика районов исследования

2.2.1. Характеристика почв на территории Кирова - Чепецкого химического комбината

Кирово-Чепецк – административный центр Кирово-Чепецкого муниципального района Кировской области, находится в 22 км к юго-востоку от

г. Кирова. Основу промышленности города составляют входящие в холдинговые компании «УРАЛХИМ» и «ГалоПолимер» предприятия, ранее образовывавшие ОАО «Кирово-Чепецкий химический комбинат» им. Б. П. Константинова (КЧХК). В настоящий момент к их числу принадлежат ЗАО «Завод Минеральных Удобрений КЧХК», ООО «ГалоПолимер Кирово-Чепецк» и др. Данные заводы относятся к химически опасным предприятиям, в связи с чем, ОС на территории вблизи комбината за десятилетия его производственной деятельности подвергалась воздействию широкого спектра загрязнителей, в том числе и ТМ (Скугорева и др., 2009; Скугорева, Ашихмина, 2012). К приоритетным загрязнителям относятся такие ТМ, как Pb, Ni, Zn, Cd, Cu.

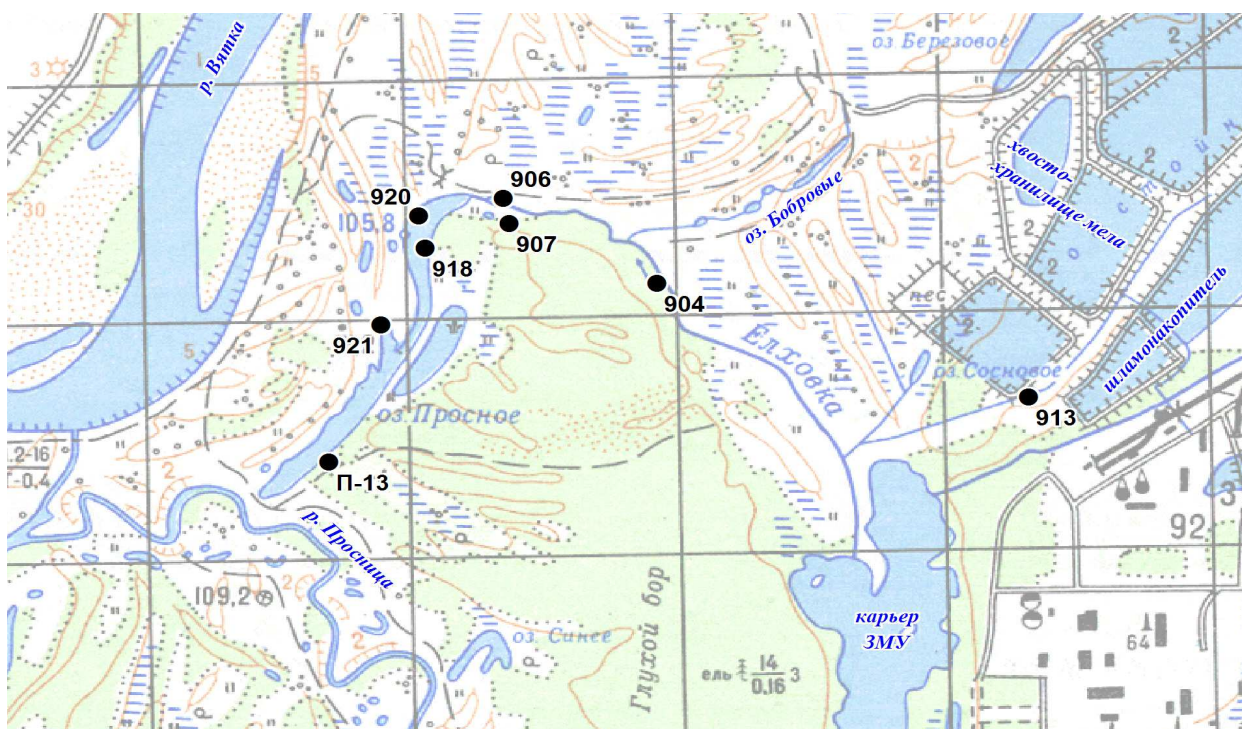


Рисунок 1. Схема расположения участков отбора почвенных образцов

Загрязнение почв в окрестностях предприятий обусловлено воздушными выбросами и стоками, сбрасываемыми по 5 выпускам в открытую гидрографическую сеть как с предприятий, так и из шламонакопителей, а также фильтрующимися и поступающими с поверхностным стоком водами.

Характеристика участков отбора почвенных образцов в зоне действия
КЧХК

№ участка	Тип почв	Местоположение	Антропогенное вмешательство в естественный почвообразовательный процесс
904	Аллювиальная дерновая	Берег р. Елховки в среднем ее течении, на расстоянии 1-2м от уровня воды в межень	–
906	Аллювиальная болотная	Берег правого заболоченного рукава р. Елховки в пределах 1-2м от уровня воды в межень у откоса дамбы	Строительство дамбы
907	Аллювиальная дерновая глеевая	Берег левого заболоченного рукава р. Елховки, подножье уступа первой надпойменной террасы р. Вятки	–
913	Аллювиальная болотная	Заболоченный участок между 3-й и 4-й секциями хвостохранилищ КЧХК	Строительство 4-й секции хвостохранилища
918	Аллювиальная болотная	Берег заиленной части озера Просное	Отвалы грунта
920	Аллювиальная дерновая	Пойменный луг в долине р. Вятки, примыкающий к современному руслу р. Елховки в нижнем ее течении	–
921	Аллювиальная дерновая глеевая	Пойменный луг в долине р. Вятки, примыкающий к современному руслу р. Елховки в нижнем ее течении	–
П-13	Аллювиальная дерновая глеевая	Берег оз. Просного, прибрежная полоса на расстоянии 1 м от уровня воды в межень	–

Примечание: «-» - антропогенного вмешательства не было.

КЧХК расположен в долине р. Вятки. Благодаря паводковому водному режиму в период весеннего половодья происходит, с одной стороны, распространение загрязняющих веществ в пойме и накопление их в составе наилок, с другой - частичный вынос водорастворимых соединений из почв. Следствием такого характера распределения поллютантов является отчетливая приуроченность ареалов загрязнения почв к руслу р. Елховки, к пойменным озерам (Просному, Березовому, Бобровым) и болотам. Вероятно, косвенным образом в загрязнении почв принимают участие и подземные воды.

Исследования проводились с образцами почв и грунтов, взятых на территории в зоне влияния КЧХК (участки пробоотбора №№: 904, 906,

907, 913, 918, 920, 921, П-13) (рис. 1). Участки входят в систему многолетних комплексных исследований в районе КЧХК, проводимых лабораторией биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ (Ашихмина, 2008, 2010; Скугорева и др., 2010; Дабах и др., 2013). Все почвы гидроморфные, относятся к аллювиальному типу и характеризуются различной степенью нарушенности (табл. 1). Загрязнение данной территории происходит в результате изменения гидрологического режима во время половодья, когда территория зоны техногенного влияния КЧХК затопляется, и происходит интенсивное вымывание поллютантов.

2.2.2. Экологическая характеристика почв г. Владикавказа и почв на территории горно-металлургического комбината

Владикавказ – столица Республики Северная Осетия (РСО) – Алания, крупный промышленный центр Юга России. К основным загрязнителям относятся предприятия цветной металлургии, которые контаминируют почву такими ТМ как Pb, Zn, Cd, Cu. Наиболее загрязнены ТМ почвы на территориях на северо-востоке, востоке, юге и юго-востоке от г. Владикавказ (Сокаев, 2010).

РСО – Алания, расположена на северных склонах Центрального Кавказа и прилегающих к склонам предгорных наклонных равнинах. Почвенный покров ее отличается большим разнообразием, что является прямым следствием сложности климатических и литолого-геоморфологических условий. На небольшой территории – всего 130 км с севера на юг и около 120 км с востока на запад, с общей площадью менее 8 тыс. км², распространены многочисленные типы и подтипы почв. Для горных районов характерна высотная (вертикальная) поясность почв. Почвообразующими породами являются элювий и элювий-делювий кристаллических пород на западе и известняка на востоке. Почвы горно-луговой зоны развиты в тех местах, где вследствие природных условий произрастание древесной растительности невозможно (Природные ..., 2000). Почва под застроенной ча-

стью г. Владикавказа – глинисто-черноземная с большой примесью щебня, мало пропускающая влагу. Вблизи реки распространены горно-лесные бурые оподзоленные и, местами, дерновые почвы. Сложившаяся в городе экологическая обстановка остается напряженной, что связано с высокой техногенной нагрузкой в сочетании с активными экзогенными процессами,

Для химико-микробиологического анализа были отобраны пробы почв и грунтов с территории горно-металлургического комбината (ГМК) с 3-х площадок, располагающихся в вершинах равнобедренного треугольника со сторонами 58 и 50 м (рис. 2). Пробы отбирались с поверхности и на глубине 5 см. Светлое «облако» – это загрязнение солями ТМ, видимое даже на снимках из космоса. В качестве фоновой точки была взята проба почвы на территории, расположенной в 80 км от предприятия, вблизи сельского поселения Озрек. В республике не решены экологические вопросы защиты почв и сельскохозяйственных культур от загрязнений ТМ (Зангелиди, 2009).

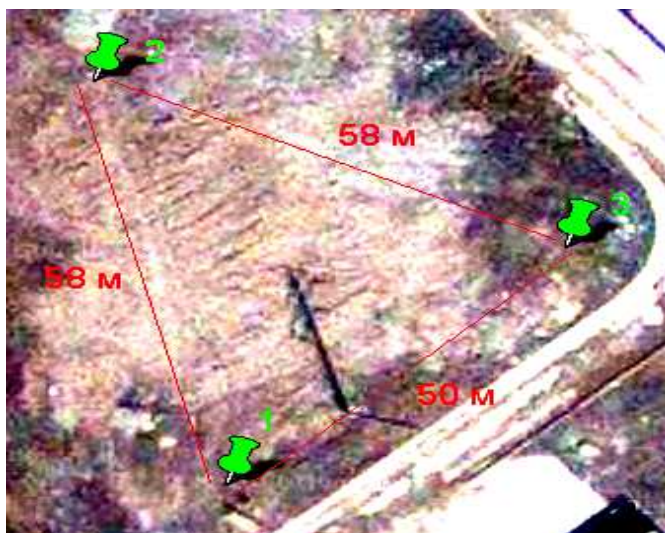


Рисунок 2. Вид сверху исследуемой территории горно-металлургического предприятия (аэрокосмическая фотосъемка)

Следующий участок для исследования находился в центре г. Владикавказа. Были отобраны образцы городских почв и грунтов осенью 2012 г. В качестве фоновой взята проба почвы вблизи поселения Гизель,

расположенного в Пригородном районе Северной Осетии, в 9 км к западу от Владикавказа. Смешанные образцы почв и грунтов отобраны с 19 площадок с глубины 0–5 см (рис. 9).

2.3. Традиционные методы исследования

Работа выполнялась с 2011 по 2014 г.г. на кафедре биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА, в русле научной тематики кафедры по «Изучению ассоциации микроорганизмов на основе ЦБ для биоремедиации почв, загрязненных фитопатогенными МО и поллютантами органической и неорганической природы» (2011-2015 г.г. № ГО м. рег. 01.2.2006. 12.047), а также на базе экоаналитической лаборатории ФГБОУ ВПО ВятГГУ и лаборатории биомониторинга института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ в русле научной тематики лаборатории «Эколого-биологические аспекты воздействия поллютантов на природные и природно-техногенные системы южной тайги».

К обсуждению результатов привлечены материалы совместных исследований с коллегами, которые отражены в общих публикациях.

Выявление видового разнообразия альгофлоры природных биопленок проведено под руководством зав. кафедрой экологии ВятГГУ, д. б. н. Л.В. Кондаковой.

2.3.1. Методика отбора почвенных проб для микробиологического и химического анализа

Отбор проб почвы для химического и микробиологического анализа осуществляли согласно требованиям ГОСТ 17.4.3.01-83 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».

2.3.2. Методы исследования почвенной биоты

Численность клеток водорослей и ЦБ определяли методом прямого счета под микроскопом (Домрачева и др., 1985; Домрачева, 2005). Повторность счета была девятикратная, в таблицах и графиках приведены средние значения, относительная ошибка которых не превышает 5%.

Определение длины мицелия микромицетов проводили на тех же мазках, где определяли численность фототрофов. Длину мицелия измеряли непосредственно с помощью окуляр-микрометра (модификация метода подсчета длины грибного мицелия по Л.М. Полянской под световым микроскопом).

Соотношение бесцветных и меланизированных форм микромицетов определялось прямым микроскопированием согласно аттестованной методике определения токсичности проб почв методом биоиндикации по соотношению микромицетов с окрашенным и бесцветным мицелием № 224.03.13.048/2009. Метод позволяет определить вклад в структуру популяции микромицетов форм с окрашенным и бесцветным мицелием. Наличие меланизированных форм указывает на увеличивающееся напряжение экологической обстановки данного региона (Домрачева и др., 2008).

Видовой состав фототрофов выявляли постановкой чашечных культур со стеклами обрастания и водных культур (Голлербах, Штина, 1969). Титр клеток ЦБ культурах почвенных ЦБ определяли с помощью камеры Горяева (Практикум..., 2005).

Учет численности сапротрофной микрофлоры проводили методом посева на селективные питательные среды (Теппер, 2004).

Чувствительность клеток ЦБ к ТМ определяли по их жизнеспособности, учитывая активность дегидрогеназы тетразольно-топографическим методом (Домрачева и др., 2008). Для этого гомогенизированную культуру ЦБ после отмывания водой выдерживали в 0,075 % растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) 3 часа. За этот период бесцветный

ТТХ, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформаза, имеющий красную или малиновую окраску. Чтобы определить соотношение жизнеспособных и неживых клеток в культуре, готовили мазки на предметных стеклах (по 9 мазков на каждый вариант опыта) и с помощью иммерсионного микроскопа просчитывали не менее 500 клеток в каждой повторности. При количественном учете дифференцировали клетки с ярко-красными кристаллами формаза внутри (считая их жизнеспособными с выраженной дегидрогеназной активностью) и клетки без кристаллов (считая их неактивными и нежизнеспособными).

2.3.3. Методы исследования химических характеристик субстратов

Определение содержания подвижных и валовых форм ТМ. Содержание подвижных и валовых форм ТМ было проведено методами инверсионного электрохимического анализа (ИВА) и атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) в соответствии с методикой «Методика выполнения измерений массовых долей токсичных металлов в пробах почв атомно-абсорбционным методом. ФР.1.31.2007.04106.».

Сущность инверсионного электрохимического анализа основана на адсорбционном концентрировании диметилглиоксиматных комплексов Ni на поверхности рабочего электрода. Сигналом является появление пика катодного восстановления адсорбированного комплекса, положение которого характеризует данное вещество (в зависимости от условий для Ni может находиться при потенциале 1000 ± 200 мВ), а его высота пропорциональна концентрации ТМ в растворе (Сборник ..., 2004). Для остальных ТМ суть проведения анализа на приборе марки «Экотест-ВА» с датчиком «Модуль ЕМ-04» состоит в том, что из фонового раствора, содержащего нитрат Hg^{2+} , на поверхности рабочего электрода восстанавливается металлическая ртуть, образуя пленку. На этой пленке происходит накопление ТМ, переход которого обратно в раствор идет при определенном значении напряжения, характерного для каждого ТМ. Возникает сила тока, пропорциональная

концентрации переходящих с электрода ионов ТМ. Графическое выражение \square пик, площадь которого отражает концентрацию ТМ в растворе. Метод отличается высокой чувствительностью и простотой анализа.

Измерения концентрации ТМ проводили и методом ААС на спектрометре «Спектр-5» – однолучевой, высокоавтоматизированной модели с атомизацией в пламени. В атомно-абсорбционном анализе измеряют поглощение, которое определяется отношением интенсивностей излучения, прошедшего через пламя без пробы и после распыления в него исследуемого раствора с ТМ (Методика ..., 2007). Метод отличается высокой производительностью, надежностью и точностью анализа.

Для приготовления почвенной вытяжки, в которой определялись подвижные формы ТМ, использовали ацетатно-аммонийный буфер с рН = 4,8. Извлечение осуществлялось при соотношении массы пробы почвы к раствору буферного раствора 1:10. Валовые формы определяли из вытяжек раствором 50 % азотной кислоты (Практикум ..., 2001).

Количественное определение нефтепродуктов. Определение содержания нефтепродуктов основано на выделении эмульгированных и растворенных нефтяных компонентов экстракцией четыреххлористым углеродом, хроматографическом отделении углеводородов от соединений других классов в колонке с оксидом алюминия и количественном их определении по интенсивности поглощения С-Н связей метиленовых (-CH₂-) и метильных (-CH₃-) групп в инфракрасной области спектра ($2930 \pm 70 \text{ см}^{-1}$). Измерение аналитического сигнала проводили на приборе «КН-2М» (Методика ..., 2000).

Определение каталазной активности. Активность каталазы (АК) определялась газометрическим методом в основе которого лежит измерение скорости распада перекиси водорода при взаимодействии с субстратом в модификации для ЦБ (Хазиев, 2006). В основе определения АК ЦБ лежит учет количества выделившегося кислорода за единицу времени (3 минуты) при действии на пероксид водорода каталазы определенной аликвоты сус-

пензии ЦБ. Контактным сосудом для ЦБ и перекиси является сосуд Ландольта, в одно колено которого помещали аликвоту суспензии ЦБ (5 мл), в другое – раствор пероксида водорода (5 мл 10%). Встряхивание сосуда приводит к их перемешиванию. Выделяющийся кислород вытесняет воду из бюретки, по изменению уровня жидкости судят о количестве выделившегося газа. АК показывает, насколько организм способен реагировать на образование перекиси водорода в присутствии стресс-факторов.

Определение перекисного окисления липидов (ПОЛ). Интенсивность ПОЛ в культурах ЦБ анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ. За основу была взята методика определения ПОЛ в растительных тканях (Лукаткин, 2002) в модификации для ЦБ (Огородникова и др., 2010). Для анализа отбирали 1 мл гомогенизированной культуры ЦБ, добавляли ТРИС-НС1 буфер (рН=7,6) и 0,5% раствор тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте. Полученный раствор кипятили на водяной бане в течение 30 минут. Оптическую плотность фильтрата определяли на спектрофотометре Spacol-1100 при длине волн 532 нм.

Определение хлорофилла а и феофитина в клетках ЦБ. Содержание хлорофилла а и феофитина определяли по монохроматической методике. Для анализа отбирали 1 мл суспензии ЦБ, добавляли 2 мл ацетона, на кончике шпателя немного соли CaCO₃ и растирали в ступке. Растертую массу переносили в пробирку для центрифугирования, полученный раствор переливали в кюветы толщиной 1 см. Далее измеряли оптическую плотность раствора, сравнивая с плотностью кюветы с ацетоном, на спектрофотометре Spacol-1100 при двух длинах волн 750 нм и 665 нм. Затем добавляли в кюветы с растворами ЦБ 0,2 мл 1% HCl и перемешивали, ждали 2-5 мин и снова измеряли оптическую плотность при двух длинах волн. Концентрацию рассчитывали по формуле предложенной Лоуренцом (Neelam, Meenu, 2009).

Определение антоциановых пигментов. Экстракцию и количественное определение антоцианов проводили по методике (Муравьева и др., 1987). Навеску массой 0,15 г мелко измельчали, помещали в колбу и добавляли 10 мл 1% HCl. В течение 20 мин выдерживали на водяной бане при $t^{\circ}=40-45^{\circ}\text{C}$. Отфильтровывали вытяжку через бумажный фильтр и измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длинах волн 510 и 657 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Содержание суммы антоцианов рассчитывали с применением удельного показателя поглощения цианидин-3,5-дигликозида в 1% -ном водном растворе HCl, который равен 453.

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 100}{(E \cdot a \cdot (100 - b))},$$

где X – концентрация суммы антоцианов, %; D – оптическая плотность испытуемого извлечения при длине волны 510 нм с учетом поправки $D(510) - 0,33 \cdot D(657)$; V – разведение; E – удельный показатель поглощения цианидин-3,5 дигликозида при длине волны 510 нм в 1%-ном водном растворе HCl; a – масса навески, мг; b – потеря в массе при высушивании, %.

Качественный состав органических (полярных и неполярных) соединений в культуральной жидкости после воздействия токсикантов определяли методом газовой масс-спектрометре GCMS-QP2010 Plus (Росинский, 2011). Пробоподготовка состояла в обработке суспензии соляной кислотой и приготовлении вытяжки смесью этилового спирта с четыреххлористым углеродом в соотношении 1:1.

Кислотность среды (рН почвенной вытяжки) измеряли при соотношении почва:вода=1:2,5 на рН-метре «рН-150МИ». Данный способ отличается удобством и высокой токсичностью и позволяет измерять в более широком диапазоне, более точно (до 0,01 единицы рН), чем при помощи индикаторов.

2.3.4. Новые разработки

Способ очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди

Метод очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди двухвалентной, относится к области биотехнологии. Способ характеризуется тем, что проводят контактирование водного раствора, содержащего $20 \text{ мг Cu}^{2+}/\text{дм}^3$, с $0,2 \text{ г}$ суспензии гомогенизированной (при $1\text{--}5$ минут при 9000 об./мин) природной биопленки, выращенной в течение $0,5\text{--}2$ месяцев на среде Громова № 6 с азотом, на 1 дм^3 раствора в течение от 1 до 3 часов. Обеспечивается очистка раствора от ионов меди двухвалентной до концентрации близких к $\text{ПДК}=0,1 \text{ мг/ дм}^3$ и ниже.

В начале исследования изучали влияние массы ЦБ с доминированием р. *Phormidium* на остаточное содержание ионов меди и никеля в растворе, а также выявляли ту массу ЦБ, при которой остаточное содержание массы ТМ, при которой остаточное содержание ионов меди и никеля достигает значения меньше ПДК ($0,1 \text{ мг/дм}^3$ для воды водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования). Концентрация ТМ в растворе составляла 20 мг/дм^3 , продолжительность контакта – 24 часа.

Исследовали сорбционную способность природных биопленок с доминированием р. *Phormidium* в гомогенизированном и пленочном состоянии при воздействии ионов ТМ (Cu и Ni) 20 мг/дм^3 . Опыт проводили с биомассой ЦБ, равной $0,024 \text{ мг/100 см}^3$ раствора, продолжительность экспозиции составляла 24 ч.

Проанализировано влияние продолжительности контакта на остаточное содержание металлов в растворе. Для этого довели титр ЦБ рода *Phormidium* до $(1,10 \pm 0,15) \cdot 10^{10} \text{ кл./см}^3$, что составляет $0,031 \text{ г/100 см}^3$. Растворы сульфата Cu и Ni имели концентрацию ионов ТМ 20 мг/дм^3 . Продолжительность контакта ЦБ с растворами ТМ варьировала в пределах $1 \text{ ч}, 24 \text{ ч}, 14$ суток.

По предлагаемому способу извлечения ТМ из промышленных и сточных вод получено решение о выдаче патента на изобретение (Патент на изобретение № 2501745 «Способ очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди». Заявка № 2012109029. Приоритет изобретения 11 марта 2012 года. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 20 декабря 2013 года).

Определение интенсивности биохемилюминесценции почвенных цианобактерий в условиях загрязнения медью (II) и никелем (II)

Определение интенсивности биохемилюминесценции (БХЛ) проводили с помощью регистрации кинетической кривой спонтанной люминол-независимой хемилюминесценции. Измерения проводили на биохемилюминиметре БХЛ-07 (ЦНИЛ НГМА; «ИМБИО» Н. Новгород, Россия), регистрировали максимальную интенсивность быстрой вспышки (I_{\max} , мВ), светосумму (S – площадь под кривой, мВ·сек) свечения пробы, величина которой обратно пропорциональна общей антиоксидантной активности. Для этого в измерительную кювету вносили 1 мл взвеси ЦБ, помещали в измерительную камеру и включали режим термостатирования ($+37^{\circ}\text{C}$). Измерение \square 30 с.

Опыты были проведены с альгологически чистой культурой почвенной ЦБ *N. linckia*, которую предварительно выращивали на жидкой питательной среде Громова № 6 без азота в течение 2-х месяцев в люминостате при постоянной температуре ($+25^{\circ}\text{C}$) и 12-ти часовом освещении (3000 лк). Токсикантом являлась соль меди – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Перед использованием культуру разбивали на гомогенизаторе при 9000 об./мин в течение 5 минут. Оптимальный титр *N. linckia* для биотестирования определяли в присутствии ионов Cu^{2+} с концентрацией 2 мг/дм³. Продолжительность контакта составляла 12 часов. Для исследования брали суспензии с титрами $1,22 \cdot 10^9$; $0,61 \cdot 10^9$; $0,31 \cdot 10^9$; $0,15 \cdot 10^9$; $0,08 \cdot 10^9$ кл./мл. Контролем служили варианты с аналогичным титром, но без добавления соли меди. Вели исследование

чувствительности культуры *N. linckia* при концентрациях ионов Cu^{2+} близких к значению ПДК: в области концентраций от 0,1 до 1,0 мг/дм³. На следующем этапе эксперимента расширили область концентраций токсиканта (0,1; 1; 10 мг/дм³) и экспериментировали с различным временем экспозиции (12 и 24 ч).

Для изучения интенсивности БХЛ при воздействии ТМ использовали также природные биопленки ЦБ с доминированием р. *Phormidium* в условиях загрязнения среды Cu^{2+} и Ni^{2+} . Для этого пленки в течение 2-х месяцев поддерживали на среде Громова № 6 с азотом в люминистате при постоянной температуре (+25°C) и 12-ти часовом освещении (3000 лк) и перед опытом доводили до титра $(8,6 \pm 1,35) \cdot 10^9$ кл./мл. Исходную суспензию разбавляли в 2, 4, 8 и 16 раз, получая, таким образом, пять вариантов с различным разбавлением. К суспензиям культур с различным разведением добавляли растворы солей Ni^{2+} и Cu^{2+} , создавая концентрацию ионов металлов во всех вариантах 20 мг/дм³. В качестве контроля были суспензии ЦБ с различным разведением, но без добавления ТМ. Через 24 ч проводили оценку интенсивности БХЛ.

Также объектами исследования были природные пленки с доминированием ЦБ *N. commune*. Изучали влияние на них ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} в концентрациях равных 2 мг/дм³ и 20 мг/дм³, а также смеси ионов токсикантов в вышеуказанных концентрациях. Измерение интенсивности БХЛ вели через 1 ч и 24 ч.

Исследование электропроводности цианобактерий при воздействии тяжелых металлов (меди и никеля)

Принцип исследования выхода электролита заключается в измерении электропроводности водного раствора, в который погружена культура ЦБ после контакта с токсикантом, до и после кипячения. Перед выполнением измерений ЦБ промывали раствором ЭДТА, тем самым удаляя ионы металлов с поверхности клеток и устраняя их побочное влияние на значения электропроводности (Гришенкова, 2005).

Методика исследование электропроводности ЦБ: 1. Гомогенизированную (11000 об/мин в течение 5 минут) культуру ЦБ помещают в растворы токсикантов (повторность трехкратная). Объем раствора 30 мл, имитирует сточную воду, в него и добавляем культуру ЦБ. 2. Отбирают по 5 см³ из каждой повторности, центрифугируют. К осадку добавляют 5 см³ раствора ЭДТА концентрации 0,03 моль/дм³, центрифугируют. Затем осадок промывают 2 раза по 5 см³ дистиллированной водой, центрифугируют в течение 5 минут. 3. Культуру ЦБ из пробирки количественно переносят в стакан с дистиллированной водой (конечный объем воды в стакане составляет 75 см³). Выдерживают культуру в течение 1 часа. Измеряют электропроводность раствора кондуктометрическим методом. 4. Стакан с ЦБ из п. 3 ставят на плитку и доводят до кипения, остужают до комнатной температуры, доводят объем до исходной величины, отстаивают и измеряют электропроводность раствора.

Особенности накопления ионов никеля (II) и меди (II) в различных фракциях клеток цианобактерий

Культуру ЦБ с титром $1,2 \cdot 10^9$ кл/см³ вносили в раствор сульфатов Cu²⁺ и Ni²⁺ с концентрацией ионов металлов 2 и 20 мг/дм³. Выдерживали в течение 1 и 14 суток. Выделяли Cu²⁺ и Ni²⁺, сорбированные на поверхности клеток, поглощенные клеткой и и удерживаемые лиофильными и лиофобными фракциями гомогенизированной культуры МО. Для выделения сорбированных на поверхности клеток ионов ТМ суспензию центрифугировали, осадок обрабатывали раствором ЭДТА. Оставшийся после промывания осадок растирали, лиофобную и лиофильную фракции разделяли смесью четыреххлористого углерода (ЧХУ) с этиловым спиртом (Васильева, 2012).

Методика десорбирования элементов, связанных с поверхностными структурами клетки: 1. Отбираем 5 мл исследуемого раствора в пробирку, центрифугируем при 3000 об./мин в течение 5 мин. 2. Центрифугат отбрасываем, к осадку добавляем 5 мл дистиллированной воды, центрифугируем

5 мин. Сливаем центрифугат. 3. К осадку добавляем 5 мл 0,03 М раствора трилона Б, оставляем на 30 мин. 4. Центрифугируем при 3000 об./мин в течении 10 мин. 5. Отделяем центрифугат от осадка. Сливаем центрифугат в фарфоровую чашку. 6. Снова добавляем трилон Б, центрифугируем и сливаем центрифугат в чашку. 7. Осадок не выкидываем, он идет на фракционирование биомассы. 8. Замеряем количество центрифугата (~10 мл). 9. Проводим пробоподготовку (минерализация до влажных солей по усовершенствованной методике для ИВА). Для этого к 5 мл центрифугата добавляем 1 мл концентрированной HNO_3 . Ставим на водяную баню и выпариваем досуха. Если остаток желтый, то добавляем по 1 мл H_2O_2 , выпариваем, если остаток не осветлился, то снова добавляем H_2O_2 до тех пор, пока остаток не станет белым. В заключении добавляем 1 мл 1М HCl . Выпариваем досуха.

Фракционирование биомассы: 1. Работу проводят в вытяжном шкафу! Осадок из п. 5 растираем в ступке в смеси 1 мл этилового спирта ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) и 2 мл четыреххлористого углерода (CCl_4). Переливаем смесь в пробирку и оставляем на 1 час в холодильнике. 2. Центрифугируем. 3. Переносим по 1 мл каждой фракции в фарфоровую чашку, отбор проводим автоматической пипеткой, начиная с водной фракции, аккуратно не засасывая осадок ЦБ, потом переходим к органической фракции, которая находится под осадком. Высушиваем на воздухе (в вытяжном шкафу и под вентилятором) досуха. 4. Проводим пробоподготовку аналогично п. 7.

Количественное определение формазана в клетках цианобактерий

В качестве маркерных признаков жизнеспособности клеток ЦБ был выбран показатель образования в их клетках кристаллов формазана красного цвета из бесцветного 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида. Образование формазана индуцируется деятельностью фермента дегидрогеназы, который работает в живых клетках и инактивируется в клетках погибших.

При отработке количественного метода определения формазана необходимо решить следующие задачи: 1. Провести скрининг штаммов ЦБ, наиболее пригодных в данном случае. Так, при отработке тетразольно-топографического метода определения жизнеспособности клеток ЦБ из испытанных штаммов ЦБ наиболее чувствительным оказалась альгологически чистая культура *N. linckia*. 2. Разработать приемы разрушения клеточной стенки ЦБ для максимально полного высвобождения формазана из клеток. 3. Подобрать оптимальную плотность популяции ЦБ, обеспечивающую максимальную точность метода. 4. Провести сравнение точности обоих методов при биотестировании загрязненных сред.

Данные этапы отрабатывались при определении токсичности ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} на культуре *N. linckia* (Огородникова и др., 2013).

Определение качественного состава органических веществ в культуральной жидкости цианобактерий

При дистанционной детоксикации связывание ионов ТМ осуществляется экзополисахаридами в культуральной среде. Поэтому возникла необходимость анализа состава органических соединений в культуральной жидкости. Для опыта использованы природные пленки с доминированием р. *Phormidium* предварительно выращенные в течение 2-х месяцев на среде Громова № 6 с азотом. Культуру микроорганизмов помещали в индивидуальные растворы сульфатов Cu и Ni с концентрацией ионов металлов 2 и 20 мг/дм³, а также смеси с аналогичными концентрациями. Контролем служила культура, помещённая в дистиллированную воду. Через 1 и 14 суток определяли качественный состав органических соединений в фильтрате культуральной жидкости методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе GCMS-QP2010 Plus (Росинский, 2011). Пробоподготовка состояла в обработке суспензии соляной кислотой и приготовлении вытяжки смесью этилового спирта с четыреххлористым углеродом в соотношении 1:1.

Определение морфологии поверхности клеток цианобактерий

Морфология поверхности клеток была изучена с помощью электронного микроскопа JSM-6510 Scanning Electron Microscope (Дурнев, 2011) методом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). Система управления микроскопом содержит программно предустановленные параметры, оптимизированные для просмотра разных типов образцов. Пользователю достаточно выбрать из практически исчерпывающего набора типов материалов, тот который наиболее соответствует образцу. Микроскоп начнет автоматически откачивать камеру и выберет оптимальные параметры получения изображения подходящие для данного образца.

Сканирование вели в режиме атомно-силовой микроскопии на СЗМ NanoEducator в полуконтактном режиме. Разрешающая способность скана составила 50 нм в горизонтальной плоскости и 4 нм по вертикали. Образцы цианобактерий готовили осаждением из культурального раствора на чистое покровное стекло с последующим высушиванием при 20°C.

Для опыта были использованы биопленки с доминированием р. *Phormidium*, предварительно выращенные в течение 2-х месяцев на среде Громова № 6 с азотом, после воздействия ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} с концентрацией 2 и 20 мг/дм³, а также их смеси с аналогичными концентрациями.

2.3.5. Методика микрополевого опыта

Конкретная методика постановки опыта описана в Главе V.

2.3.6. Статистическая обработка и достоверность результатов

Интегральный показатель загрязнения

Оценка уровня загрязнения почв как индикатора неблагоприятного воздействия на здоровье населения проводится по показателям, разработанным при сопряженных геохимических и геогигиенических исследованиях ОС городов. Одним из критериев является интегральный показатель

загрязнения (ИПЗ). Данный показатель применяется с целью унификации, с одновременным указанием среды загрязнения.

При оценке уровня загрязнения водоемов, атмосферы, почвы и продуктов питания он фактически определяется на базе одной и той же известной формулы:

$$\text{ИПЗ} = \frac{C_1}{\text{ПДК}_1} + \frac{C_2}{\text{ПДК}_2} + \dots + \frac{C_n}{\text{ПДК}_n} = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{\text{ПДК}_i},$$

где C_i - концентрация i -го вещества в соответствующей окружающей среде, ПДК_i - предельно допустимая концентрация i -го вещества, n - число оцениваемых загрязнителей.

На основании расчета Z_c создается оценочная шкала градация загрязнения почвы. В ее основе – исследования о состоянии здоровья человека. Категории загрязнения почвы: допустимая – $Z_c < 16$ – наиболее низкий уровень заболевания детей и минимум функциональных отклонений; умеренно опасное $Z_c = 16 - 32$ – увеличение общего уровня заболеваемости; опасное $Z_c = 32 - 128$ – увеличение общего уровня заболеваемости, увеличение числа людей с хроническими заболеваниями, увеличение нарушений сердечно-сосудистой системы; чрезвычайно опасное $Z_c > 128$ – увеличение заболеваемости детей, нарушение репродуктивной функции женщин (Саега и др., 1990).

Коэффициенты корреляции

Для проведения биотестирования можно использовать несколько подходов. Самый распространенный – фиксация реакции организмов на влияние поллютантов. Однако часто появляются факты, которые затрудняют выявление истинного состояния объекта из-за неоднозначной реакции живых организмов на антропогенное действие (Плеханов и др., 1990; Штина, 1990; Домрачева и др., 2008; Дорохова, 2012; Фокина и др., 2012).

Существует несколько способов определения коэффициентов корреляции. В качестве коэффициента корреляции между переменными, принадлежащими порядковой шкале, применяется коэффициент Спирмена, а для

переменных, принадлежащих к интервальной шкале, – коэффициент корреляции Пирсона. При использовании коэффициента Спирмена условно оценивают тесноту связи между признаками, считая, что с увеличением коэффициента усиливается теснота связи. Коэффициент корреляции Пирсона, характеризует степень линейной зависимости между переменными. Чем ближе его значение к «+1», тем выше строгая линейная зависимость величин.

Коэффициенты корреляции в данной работе использовались для определения зависимости между показателями, для указания степени взаимосвязи между характеристиками объектов.

Достоверность результатов

Оценка достоверности результатов базируется на основе глубокого анализа материалов, полученных в ходе лабораторных и полевых исследований с использованием классических статистических методов и с применением современного программного обеспечения (Microsoft Excel 2007, Statistica 6.0, MapInfo 7.5), показавших точность и воспроизводимость полученных данных. В итоге, при сравнении авторских данных и материалов, полученных ранее по рассматриваемой тематике отечественными и зарубежными исследователями, в большинстве случаев установлено, что во многих случаях наблюдается качественное и количественное совпадение результатов. Несовпадение полученных результатов с данными из независимых источников объясняется различиями в экологических условиях, методах исследования, условиях проведения, в специфике исследуемых групп МО. Погрешность в приведенных табличных данных представляет из себя границы доверительного интервала при $P=0,95$.

ГЛАВА III. СПЕЦИФИКА МИКРОБНЫХ ГРУППИРОВОК ПОЧВ И ГРУНТОВ ТЕХНОГЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Антропогенная нагрузка ОС приводит к активной циркуляции в них широкого спектра продуктов техногенеза. Вокруг предприятий-загрязнителей формируются локальные аномалии, где содержание ТМ представляет потенциальную опасность. Поллютанты загрязняют почву, которая обладает способностью к их аккумуляции, и является основным объектом техногенного воздействия. Почвенная микрофлора отличается высокой чувствительностью к внешним воздействиям и первой реагирует на изменение параметров среды обитания (Мишустин, 1975; Штина, Голлербах, 1976; Давыдова, 1991; Дубовик, 1995; Глазовская, Геннадиев, 1995; Громов, 1996; Заварзин, 2003; Кузякина, 2004; Соколов и др., 2010; Горностаева и др., 2011). Именно почвенный микробоценоз при техногенном загрязнении осуществляет важную функцию детоксикации поллютантов. Так, Г.А. Евдокимовой (2014) рассмотрена концептуальная основа эколого-микробиологического подхода к охране почв от химического загрязнения, который базируется на деструкционной деятельности почвенной биоты, разлагающей химические вещества до более простых соединений. Но, несмотря на это, в связи с развитием промышленности увеличивается поток в биосферу «неподатливых» микробам веществ, которые в естественной среде разрушаются очень медленно и способны накапливаться в больших количествах в почве (Евдокимова, 1995; Закирова, 2006; Корельский, 2008).

3.1. Химическое загрязнение почв и грунтов техногенных территорий

Исследования были проведены с образцами техногенно преобразованных почв и грунтов, отобранных на территории КЧХК, расположенного в Кировской области, и на территории одного из ГК г. Владикавказа (РСО).

В почве на территории КЧХК максимальное превышение показателей ПДК наблюдается по Pb, которое увеличено в 6,3; 5,8; 5,5 раз в пробах П-13, 918, 907 соответственно (табл. 2). Превышение по Ni в исследуемых пробах наблюдается в 4,25 раза и составляет 17 мг/кг. Во всех остальных случаях превышение уровня ПДК более, чем в 3 раза, не обнаружено. Самые загрязненные пробы (918, П-13, 907) расположены вдоль озера Промное, что говорит о загрязненности данного водоема и прилегающей к нему территории. Судя по содержанию ТМ в пробе почвы фоновой территории, даже на расстоянии 80 км заметно влияние комбината.

Таблица 2

Содержание подвижных форм тяжелых металлов в почве горно-металлургического и химического комбинатов (мг/кг)

Варианты	Cu	Pb	Cd	Ni	Zn
Зона горно-металлургического комбината					
Контроль	0,49±0,02	6,05±0,15	0,09±0,01	1,18±0,004	71,00±0,71
1 участок	46,25±0,35	185,00±17,20	119,00±18,00	25,01±0,10	1400±106,06
2 участок	2895,75±3,18	7736,00±5,65	298,75±4,59	42,75±0,36	8187,50±159,00
3 участок	91,50±1,41	829,25±14,5	34,25±0,35	5,80±0,31	3350,00±144,0
Зона химического комбината					
904	0,75±0,17	3,9±0,8	0,48±0,12	3,9±1,1	13±4
906	2,4±0,6	25±5	1,08±0,27	17±5	32±10
907	3,6±0,8	33±7	1,7±0,14	9,0±2,5	73±24
913	0,55±0,13	1,9±0,4	0,11±0,03	2,1±0,6	1,8±0,6
918	4,0±1,0	35±7	2,1±0,5	7,2±2,0	87±29
920	0,90±0,21	11,9±2,5	0,56±0,14	3,6±1,0	16±5
921	0,87±0,2	8,1±1,7	0,48±0,12	3,8±1,1	21±7
П-13	3,3±0,8	38±8	1,8±0,5	6,3±1,8	64±21
ПДК (ОДК)	3,0	6,0	0,5	4,0	23,00

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели, превышающие значения ПДК.

По результатам химического анализа почвенных образцов, взятых у ГМК, можно судить о сильнейшем загрязнении рассматриваемых почв и грунтов. На всех опытных участках содержание валовых и подвижных форм таких элементов, как Pb, Ni, Cu, Cd и Zn, во много раз превышает значения ПДК (табл. 2). На фоновом участке показатели содержания ТМ не превышают значения ПДК, кроме содержания Zn, которое выше в 3 раза. Максимальное превышение содержания подвижных форм всех рассмот-

ренных ТМ наблюдалось на участке 2, где содержание Pb в 1289 раз выше значения ПДК (7736,00 мг/кг), Cu – в 965 раз (2895,75 мг/кг), Cd – в 596 раз (298,75 мг/кг), Zn – в 356 раз (8187,50 мг/кг), Ni – в 11 раз (42,75 мг/кг). Концентрация ТМ настолько велика, что даже в процессе пробоподготовки окраска раствора была яркой зеленовато-голубой, обусловленной наличием солей Ni (II) и Cu (II). Таким образом, наиболее загрязненными участками из исследованных являются участки 2 (ГМК) и № 918 (КЧХК) (табл. 1). В пробе со второго участка ГМК превышение ПДК наблюдается по всем металлам – Cu, Pb, Cd, Ni и Zn, а на участке 918 ПДК превышено по 3-м из 5-ти ТМ - Cu, Cd, Zn.

По данным, приведенным в таблице 3, видно, что соотношение содержания подвижных форм металлов на поверхности и на глубине 5 см, взятых на территории химического комбината, значительно отличается.

Таблица 3

Отношение содержания подвижных форм тяжелых металлов в глубинном и поверхностном слоях

№ участка	Cu	Pb	Cd	Ni	Zn
1 участок	1:9,03	1:13,65	1:2,49	1:1,16	1:17,71
2 участок	1:1,60	1:1,35	1:1,60	1:13,15	1:10,59
3 участок	1:16,93	1:15,81	1:4,55	1:3,47	1:7,04

Самой загрязненной оказалась проба, отобранная с поверхности участка №2. На глубине 5 см содержание ТМ снижается, хотя и превышает уровень ПДК в десятки и тысячи раз. Наименее загрязнены участки №№ 1 и 3. Прослеживается закономерное снижение концентрации металлов с глубиной, т.е. основная часть ТМ находится в поверхностном слое, в виде пленки, вероятно и потому, что почвы в данной местности – дерновые и дерново-глеевые. Это значит, что они являются «менее проницаемыми» и имеют более плотную структуру, в отличие от гидрогенных аллювиальных почв и грунтов на территории КЧХК.

Реакция МО на действие ТМ во многом зависит от величины рН, которая может как повышать, так и снижать степень токсичности ТМ. Ки-

слотность изучаемых почв и грунтов колебалась от слабокислой до почти нейтральной (рис. 3). Ранее было показано, что токсичность Cu и Ni возрастает при низких значениях pH, вероятно, это обусловлено возрастанием подвижности соединений ТМ и их ионов и увеличением биологической доступности металлов (Евдокимова, 1995).

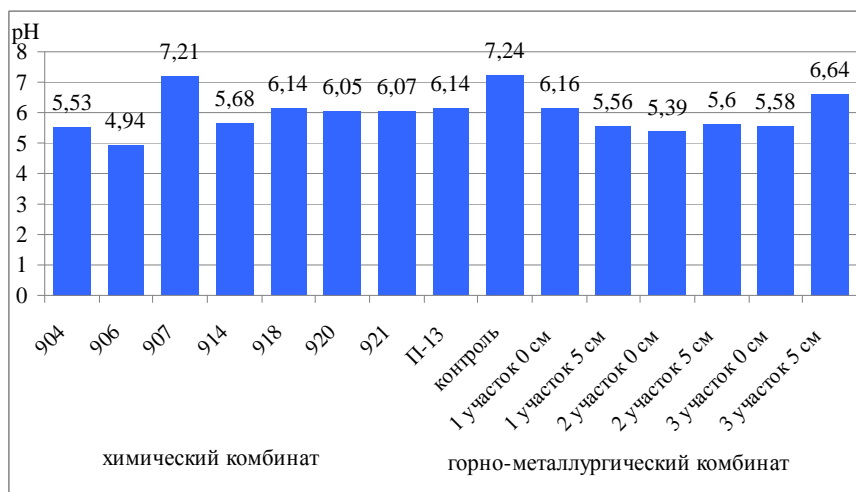


Рисунок 3. Уровень кислотности почвенных образцов

3.2. Состояние микробных комплексов почв техногенных территорий

Техногенез обусловил создание особых условий для развития почвенных МО. Возникло даже понятие – техногенные экосистемы, которые изучают наряду с другими преобразованными человеком экосистемами: агроценозами, урбоэкосистемами. В зависимости от силы, направленности и характера техногенных воздействий формируются специфические микробные сообщества почв и субстратов. В частности, было изучено состояние микробиоты КЧХК и ГМК.

3.2.1. Микробные комплексы почв Кирово-Чепецкого химического комбината

Почвы КЧХК характеризуются чрезвычайно невысокими показателями микробной численности: общее микробное число существенно ниже показателей численности МО, характерных для данных типов почв незагрязненных территорий (табл. 4).

Общее микробное число микроорганизмов на территории КЧХК, тыс.
КОЕ/г

№ участка	904	906	907	913	918	920	921	П-13
Значение	70,7	40,5	57,4	70,4	171,9	51,3	48,7	68,2

Так, максимальный показатель численности МО в почве на территории КЧХК наблюдается в пробе № 918 – 171920 КОЕ/г, а минимальный – 40500 КОЕ/г на участке № 906. Такие низкие показатели численности МО в почвах КЧХК объясняются многолетним воздействием широкого спектра загрязнителей, что могло послужить ингибитором роста МО.

3.2.2. Микробные комплексы почв на территории горно-металлургического комбината

Почва фоновой территории ГМК характеризуется численностью МО, типичной для любых типов почв: десятки тысяч КОЕ/г микромицетов и дрожжей, миллионов КОЕ/г аммонификаторов, сотни тысяч КОЕ/г актиномицетов, тысячи азотфиксаторов КОЕ/г (рис. 4).

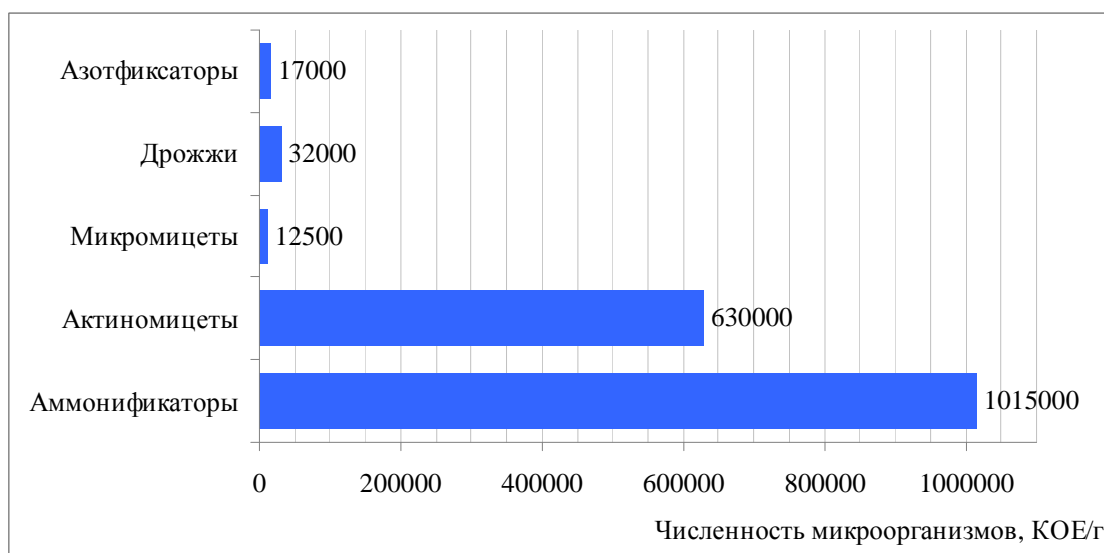


Рисунок 4. Численность микроорганизмов в почве фоновой территории, КОЕ/г

Показатели микробной численности в почве на территории ГМК существенно ниже, чем в почве фоновой территории (табл. 5).

Общее микробное число в почве на территории ГМК, тыс. КОЕ/г				
№ участка	Фоновая территория	1 участок	2 участок	3 участок
Значение	1706,5	234,5	91,0	222,6

Так, общая численность МО на территории завода характеризуется сотнями тысяч КОЕ/г (1 участок – 234500 КОЕ/г, 2 участок – 91050 КОЕ/г, 3 участок – 222650 КОЕ/г). Безусловно, столь низкие показатели микробной заселенности почв на территории ГМК обусловлены многолетним воздействием ТМ, как и на территории КЧХК.

3.2.3. Сравнительная характеристика численности различных групп микроорганизмов из почв и грунтов промышленных зон

Микробиологический анализ показал, что в почве на территории КЧХК наименее чувствительной группой к химическому загрязнению являются аммонификаторы, чье содержание превышает 50 % (рис. 5).

По абсолютным показателям «взрыв» численности наблюдается на участке № 918, где содержание МО составляет почти 80% и достигает свыше 130 тыс. КОЕ/г. На участках №№ 2 ГМК, 906 и 907 КЧХК также доминируют аммонификаторы – 55; 54,31 и 59,28 % соответственно. Это может быть связано с тем, что данная группа является чрезвычайно разнообразной, выживающей даже при минимальном запасе органических веществ. Возможно, увеличение численности аммонификаторов обусловлено наносным органическим веществом, приносимым с водами во время разлива, или какими-то другими, пока не выявленными источниками органического азота. Минимальное относительное количество аммонификаторов отмечено на участке № 3 ГМК – 13,47% от общего количества МО. Таким образом, показатели численности аммонификаторов во всех случаях, кроме участка № 918, находятся в пределах 10-30 тыс. КОЕ/г, что указывает на малое содержание свежего органического вещества, доступного для данного вида МО.

Пробы почв и грунтов ГМК наиболее ярко представлены группой актиномицетов. Так, максимальные количественные показатели развития актиномицетов наблюдаются на участке № 3 – 65,13% относительного обилия и свыше 140 тыс. КОЕ/г в абсолютном выражении. Данный факт обусловлен, вероятно, тем, что актиномицеты доминируют на поздних стадиях микробной сукцессии, когда создаются условия для использования труднодоступных субстратов. Также актиномицеты обладают многообразием метаболических путей. Еще один факт, обуславливающий высокую численность данной группы МО, – достаточно сухой климат местности, который дает преимущество актиномицетам, в отличие от немителиальных форм МО, которые не так устойчивы к высушиванию.

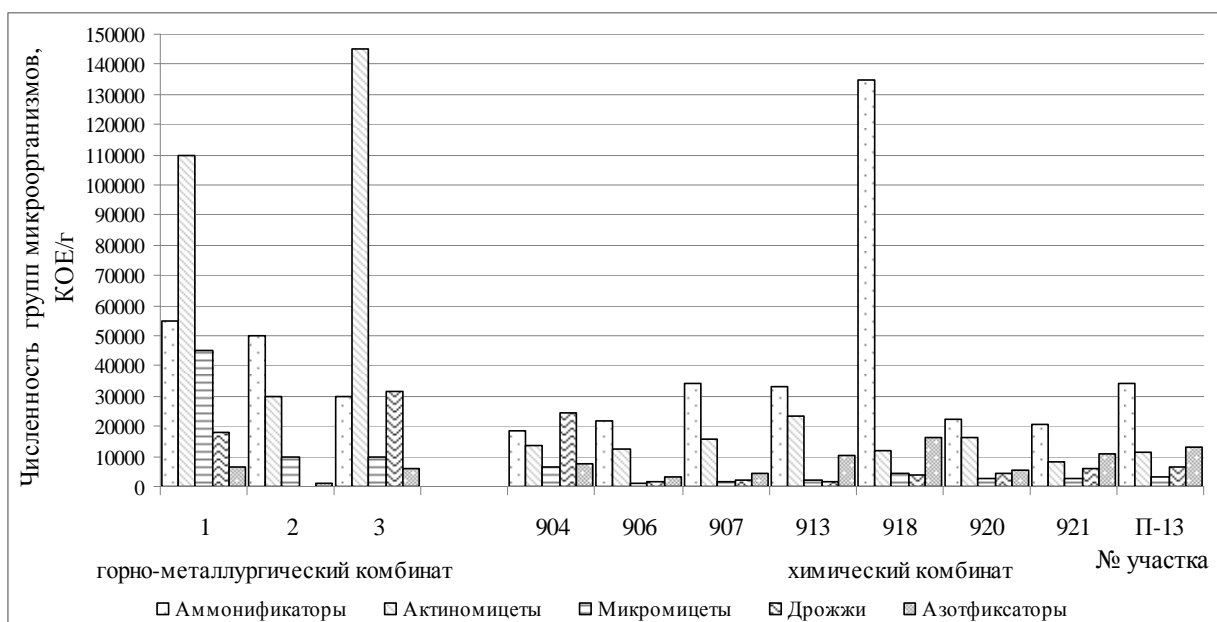


Рисунок 5. Численность различных групп микроорганизмов в почве и грунтах промышленных зон, КОЕ/г

При сравнении исследуемых проб прослеживается общая тенденция – подавление численности азотфиксаторов, особенно на территории ГМК, где максимальное содержание МО не превышает 3 % (7000 КОЕ/г), а минимальное количество составляет 0,1 % (участок № 2). Это может быть связано как с малой долей органического вещества, так и респрессирующим действием ТМ на нитрогеназу, вследствие чего представители данной группы МО практически выпадают из микробной системы.

Подавление численности микромицетов наблюдается на территории КЧХК. Например, на участках №№ 918 и 907 численность грибов составляет 2,6 %. Максимальное развитие грибов на территории ГМК наблюдается на участке № 1 – 19,19 %, что составляет 45 тыс. КОЕ/г в абсолютном значении. Снижение численности дрожжей прослеживается на обеих исследуемых территориях, но особенно сильное угнетение наблюдается во второй пробе ГМК, где дрожжи находятся в следовых количествах – 0,02 %.

Таким образом, результаты микробиологического анализа показывают, что практически все группы МО оказались неустойчивыми к загрязнению ТМ. Степень угнетения в почве разных территорий разная. Особенно сильное подавление испытывают азотфиксаторы и дрожжи (в зоне действия ГМК), и все группы МО, кроме аммонификаторов, в зоне действия КЧХК.

Таблица 6

Соотношение численности МО в глубинном и поверхностном слоях грунта промышленной зоны горно-металлургического комбината

№ участка	Аммонификаторы	Грибы	Актиномицеты	Дрожжи	Азотфиксаторы
1 участок	1:0,458	1:8,00	1:0,66	1:5,14	1:3,00
2 участок	1:10,00	1:33,33	1:10,00	1:2,50	1:0,11
3 участок	1:2,00	1:5,00	1:2,23	1:63,00	1:0,60

Сравнивая результаты количественного состава МО в поверхностном и глубинном слоях трех исследуемых участков г. Владикавказа (табл. 6), можно сделать вывод о том, что ТМ оказывают сильное влияние на глубинные группы МО, но в большей степени – на поверхностные. Это объясняется более высоким содержанием ТМ в верхнем слое из-за недостаточной проницаемости грунта. ТМ не могут полностью проникать в глубинные слои, что и объясняет разницу в соотношении МО в почвенных слоях.

В целом, результаты микробиологического исследования показывают, что практически все группы МО оказались неустойчивыми к загрязне-

нию почвы ТМ. Степень угнетения на разных территориях разная. Сильную степень подавления испытывают азотфиксаторы и дрожжи в случае почв ГМК, и все группы МО, кроме аммонификаторов, на территории КЧХК.

3.3. Структура микробных фототрофных комплексов в почвах, загрязненных тяжелыми металлами

Определение структуры фототрофных комплексов показало, что их состав достаточно богат и включает в себя ЦБ, диатомовые и одноклеточные зеленые водоросли (рис. 6).

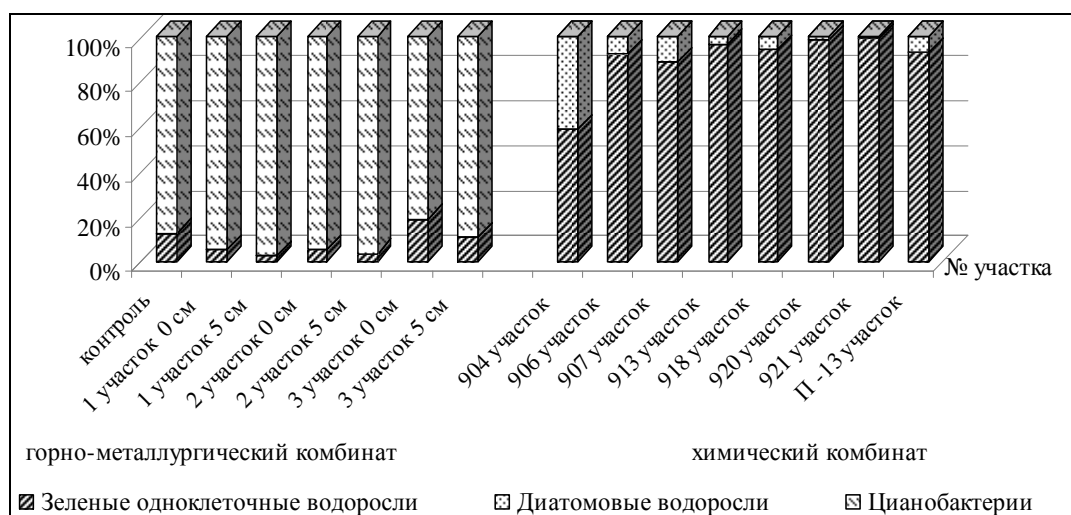


Рисунок 6. Структура альго-цианобактериальных комплексов техногенных территорий

На территории ГМК доминирующей группой являются ЦБ (почти 100 % на участках №№ 1 и 2 в слое 5 см). Неоднократно ранее отмечалось, что почвы урбанизированных и техногенных территорий, подверженные постоянному воздействию поллютантов различной химической природы, создают условия прежде всего благоприятные для развития группировок ЦБ. В тоже время в исследуемых почвенных образцах на территории КЧХК ЦБ не были обнаружены при прямом количественном учете (Горностаева и др., 2012), хотя развивались при постановке в культуру (Злобин, 2013).

Диатомовые водоросли были обнаружены во всех пробах КЧХК, т.к. данные почвы являются хорошо увлажненными, что благоприятствует развитию именно этого вида. На территории ГМК диатомеи не обнаружены.

Доминирующей группой в почвах на территории КЧХК среди фототрофных МО являются одноклеточные зеленые водоросли, представительность которых в некоторых вариантах достигает почти 100%. Такая структура фототрофных комплексов, вероятно, объясняется тем, что на исследуемой территории велика концентрация минерального азота, что приводит к стремительному размножению одноклеточных зеленых водорослей и вытеснению из структуры популяции ЦБ в целом. На территории ГМК одноклеточные зеленые водоросли обнаружены, но их содержание не превышает 11%: при минимуме на участках №№ 1 и 2 (2,6% и 3,4%) и максимуме – 10,8% на участке №3. Полученные данные говорят о том, что разнообразие поллютантов приводит к значительной пестроте (вариабельности) развития фототрофных группировок.

3.4. Микологическая индикация химически загрязненных почв

Одним из путей определения уровня загрязнения почвы является проведение микологического анализа по соотношению в структуре популяции микромицетов форм с окрашенным (меланизированным) и неокрашенным мицелием (рис. 7).

Используя вышеприведенный критерий, были установлены загрязненные участки (№№ 921 и П-13) на территории, в почве которых меланизированные грибы составляют от 65 до 80% соответственно. В то же время грунтах в зоне действия ГМК в микрокомплексах на всех участках, кроме фонового, доминируют пигментированные формы. При этом наблюдается сильная фангментация мицелия со средней длиной фрагментов – 305 фрагментов/см².

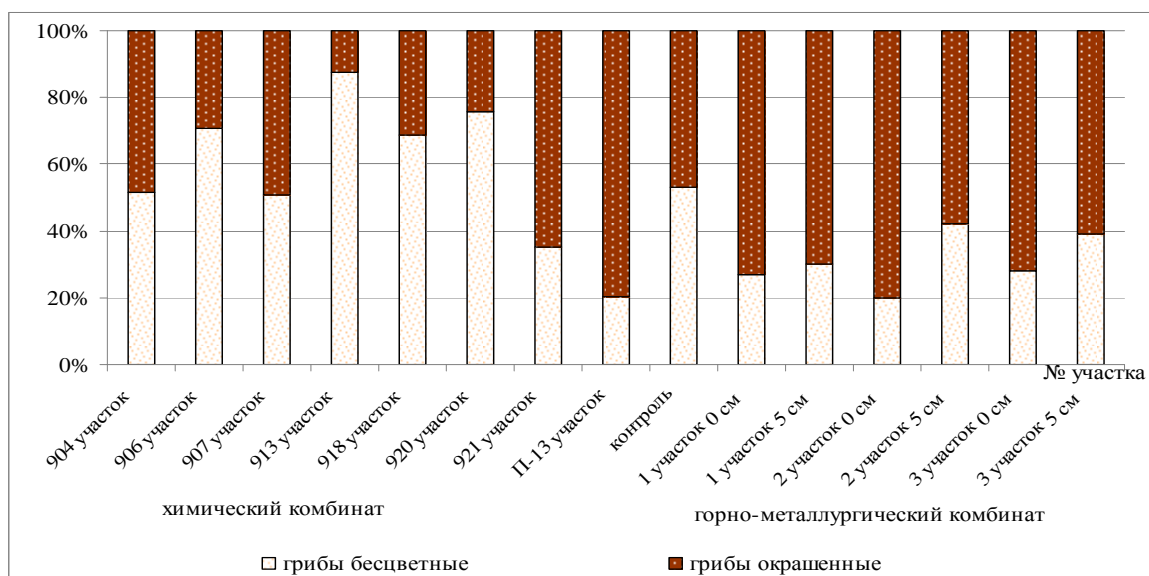


Рисунок 7. Структура микокомплексов в почвах в зоне действия промышленных предприятий

Стратегия грибов при неблагоприятных условиях часто сопровождается интенсификацией спорообразования. Так, например, увеличение удельной продукции спор, т.е. то количество спор, которое образуется на 1 метр мицелия, наблюдается на наиболее загрязненном участке № 2 ГМК (табл. 7). Приведенный пример еще раз свидетельствует о высоких адаптационных возможностях грибов.

Таблица 7

Удельная продукция спор микромицетов в образцах почв и грунтов ГМК, тыс./ м мицелия

1 участок	2 участок	3 участок
3,9	294,9	7,6

Таким образом, полученные данные по микоиндикации свидетельствует о различном уровне техногенной нагрузки на почву на исследуемых территориях.

3.5. Биотестирование токсичности почв с использованием цианобактерии *Nostoc linckia*

Об уровне токсичности почвы можно судить, не только используя методы микоиндикации, но и путем биотестирования. В наших опытах биотестирование токсичности почвенных вытяжек проводили с помощью

почвенной ЦБ *N. linckia* методом ТТХ. Определение жизнеспособности ЦБ в почвенных вытяжках с разных техногенных территорий показало, что наибольшее число нежизнеспособных клеток, достигающее в некоторых вариантах 100%, наблюдается в почвах ГМК (рис. 8).

Результаты биотестирования подтверждают результаты химического анализа, который выявил, что почвы и грунты ГМК РСО наиболее загрязнены ТМ. Данный факт подтверждается и в случае биотестирования токсичности почв с использованием ЦБ. Наибольшее число нежизнеспособных клеток наблюдается на участках №№ 1, 2 ГМК. На территории КЧХК самыми загрязненными, являются участки №№ 906 и 920, где живых клеток не выявлено совсем. Более 50 % нежизнеспособных клеток наблюдается на участке № 918. На участках №№ 907, 913 и П-13 число мертвых клеток колеблется от 20 до 40 %. Наиболее чистыми участками по результатам биотестирования являются участки №№ 904 и 921, где число жизнеспособных клеток превышает 90 %.

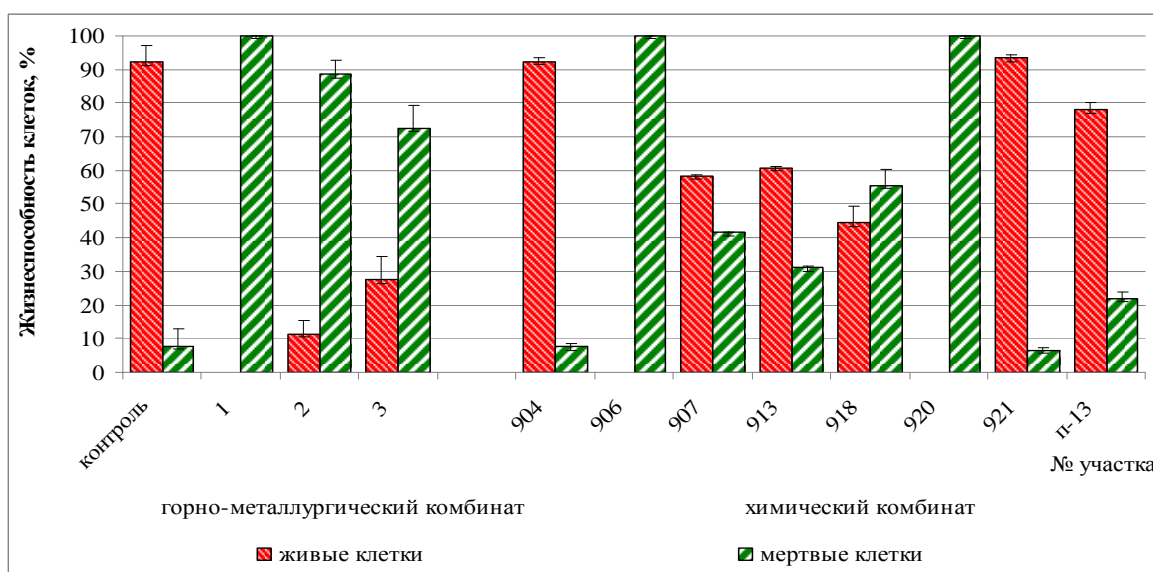


Рисунок 8. Биотестирование токсичности почвенных вытяжек с помощью цианобактерии *Nostoc linckia*

Таким образом, биотестирование токсичности почвенных вытяжек с помощью ЦБ – достаточно точный и показательный метод, который отражает реальное состояние почв и грунтов.

Сравнивая результаты биоиндикации (по грибам) и биотестирования (по ЦБ), однозначно можно сказать, что наиболее загрязненными участками в зоне действия ГМК являются участки №№ 2 и 1. При этом максимальное обилие меланизированных микрокомплексов на участке № 2 свидетельствует о длительном хронологическом химическом воздействии и адаптации МО к действию ТМ. Полная гибель ЦБ *N. linckia* в почвенной вытяжке с участка №1 и гибель почти 90% этой культуры с участка № 2 – реакция тест-культуры на острое действие поллютантов, содержащихся в почвенной вытяжке.

3.6. Развитие почвенных микробценозов в условиях свинцового стресса

Среди ТМ одним из приоритетных загрязнителей, попадающих в почву, является Рb. Соли Рb в значительной степени меняют характер функционирования микробных сообществ, вызывая определенные изменения в видовом составе и структурных характеристиках (Гузев и др., 1986; Звягинцев и др., 1997; Узварова, Вараксина, 2005; Домрачева и др., 2006; Фокина, 2008; Темралеева и др., 2011).

Таблица 8

Влияние возрастающих концентраций свинца на численность и структуру альго-цианобактериальных комплексов (лабораторный опыт)

Рb ²⁺ , мг/кг	Численность фототрофов, клеток/см ²			Структура популяций, %	
	водоросли	цианобактерии	всего	водоросли	цианобактерии
Контроль	15375	14825	30200	50,9	49,1
6	13800	12600	26400	52,3	47,7
60	2760	2210	4970	55,5	44,5
600	600	0	600	100	0
6000	25	0	25	100	0

Для изучения острого действия Рb была поставлена серия модельных лабораторных и полевых опытов по влиянию его возрастающих концентраций на сапротрофную и фототрофную микрофлору (Домрачева и др., 2013). Изучение длительного хронического действия Рb на микробные

комплексы проводили в образцах почвы, отобранных с территорий, прилегающих к КЧХК (№918) и к ГМК г. Владикавказа (№2).

В ходе модельных лабораторных опытов с возрастающими концентрациями Pb (6, 60, 600 и 6000 мг/кг) в форме ацетатной соли было установлено, что при аутогенной сукцессии происходит возрастание численности микрофототрофов как в контроле, так и при концентрациях Pb 6 и 60 мг/кг (табл. 8). При этом на 18-е сутки после постановки опыта в этих вариантах начинают развиваться и прокариотные водоросли – цианобактерии (ЦБ), хотя суммарная численность клеток водорослей и ЦБ в контроле выше, чем в вариантах с малыми дозами Pb.

Высокие дозы Pb (600 и 6000 мг/кг) в значительной степени ингибируют размножение водорослей и существенно тормозят ход сукцессии, не давая возможности размножаться ЦБ. Анализ структуры фототрофных комплексов показывает, что по мере снижения концентрации Pb нарастает представительство ЦБ, достигая почти паритета с водорослями в контроле.

В модельном полевом опыте в почву также вносили ацетат свинца с концентрациями Pb 600 и 1200 мг/кг. Отбор почвенных образцов для микробиологического анализа был проведён через 3 месяца. При прямом микроскопическом анализе отмечалось сильное репрессивное действие Pb на почвенную альгофлору (табл. 9). Численность водорослей в опытных вариантах по сравнению с контролем снизилась в 6,8 (600 мг/кг) и в 12,2 (1200 мг/кг) раза, а ЦБ – в 3,0 и 2,5 раза соответственно.

Таблица 9

Влияние возрастающих концентраций свинца на численность и структуру альго-цианобактериальных сообществ (полевой опыт)

Pb, мг/кг	Численность фототрофов, тыс. кл./г			Структура популяций, %	
	водоросли	цианобактерии	всего	водоросли	цианобактерии
Контроль	1714	2008	3782	46,1	53,9
600	250	650	900	27,7	72,3
1200	140	800	940	14,9	85,1

Синхронно со снижением общей численности фототрофов меняется и структура их популяций, что проявляется в стремительном снижении вкла-

да водорослей и возрастании значимости ЦБ в сложении альго-цианобактериальных комплексов.

Таким образом, несмотря на то, свинец снижает плотность популяций фототрофных группировок, замедляет ход альгосукцессии, на ее заключительном этапе происходит насыщение биотопа ЦБ, которые могут составлять до 85% в структуре популяций при 1200 мг/кг Pb.

При исследовании гетеротрофной микрофлоры оказался примечательным факт роста численности меланизированных микромицетов по мере увеличения концентрации Pb (полевой опыт) (табл. 10).

Таблица 10

Влияние возрастающих концентраций свинца на структуру микоценозов, %

Pb, мг/кг	Микромицеты	
	с окрашенным мицелием	с бесцветным мицелием
Контроль	47,5	52,5
600	63,8	63,2
1200	73,6	26,4

При хроническом загрязнении почвы Pb - КЧХК (38 мг/кг) и ГМК - (7736 мг/кг) отмечены следующие особенности сапротрофных комплексов: доминирование аммонификаторов среди сапротрофов (табл. 11) и доминирование меланизированных форм (у микромицетов) (табл. 12).

Таблица 11

Специфика сапротрофных микробных сообществ при длительном загрязнении почвы свинцом

Pb, мг/кг	Группы сапротрофов, %				
	Аммонификаторы	Актиномицеты	Азотфиксаторы	Микромицеты	Дрожжи
38	49,8	17,0	18,8	5,0	9,4
7736	54,9	32,9	0,9	11,0	0,3

К числу специфических особенностей структуры микоценозов при очень высоком содержании в почве Pb, превышающих ПДК почти в 1290 раз (ГМК), относится высокий процент содержания актиномицетов (почти 33%) и микромицетов (11%).

Таблица 12

Структура популяций микромицетов при хроническом загрязнении почвы
свинцом, %

Рв, мг/кг	С окрашенным мицелием	С бесцветным мицелием
38	74,6	25,4
7736	78,1	21,9

На территории КЧХК, где содержание Рв превышает ПДК в 6 раз, выделяется группа азотфиксаторов (почти 19% от общего содержания МО) и дрожжей (свыше 9%). Несмотря на то, что содержание микромицетов в почве обоих предприятий различается, структура микоценозов практически аналогична (табл. 11). В то же время при изучении фототрофных комплексов, которые развиваются в условиях длительного действия повышенных концентраций Рв, структура их на территории разных комбинатов резко различается (табл. 13).

Таблица 13

Структура фототрофных популяций при хроническом загрязнении почвы
свинцом, %

Рв, мг/кг	Водоросли	Цианобактерии
38	58,1	41,9
7736	10,8	89,2

Как правило, загрязнение почвы ТМ сопровождается цианофитизацией фототрофных комплексов факт, который отмечается нами и при проведении модельных опытов. Кажущиеся противоречия в данном случае (табл. 13, КЧХК), вероятно, можно связать с тем, что в почве на исследуемой территории велика концентрация доступного азота (NH_4^+ – 8 мг/кг, NO_3^- – 19,8 мг/кг). Это приводит к активизации размножения водорослей, в первую очередь, одноклеточных зеленых и вытеснению из структуры популяций ЦБ. Вероятно, наличие доступного азота для водорослей превалирует над репрессивным действием свинца, поэтому негативное действие отдельных токсикантов на определенные группы фототрофов может смягчаться при наличии факторов, стимулирующих размножение данной группы.

В целом, исходя из результатов опытов по хроническому действию свинца на микробные комплексы, можно сделать вывод о том, что, хотя свинец в значительной степени влияет на численность популяций и структуру микробных сапротрофных и фототрофных комплексов, при его длительном воздействии микробсообщества стабилизируются на определенном уровне развития фототрофных и сапротрофных группировок, не погибая даже при сверхвысоких концентрациях данного элемента (7736 мг Pb на кг на территории ГМК).

3.7. Оценка уровня загрязнения почвы с использованием интегральных показателей загрязнения

Состояние микробных комплексов почвы определяли не только на техногенных территориях вблизи предприятий горно-металлургического комплекса, но и непосредственно в г. Владикавказе.

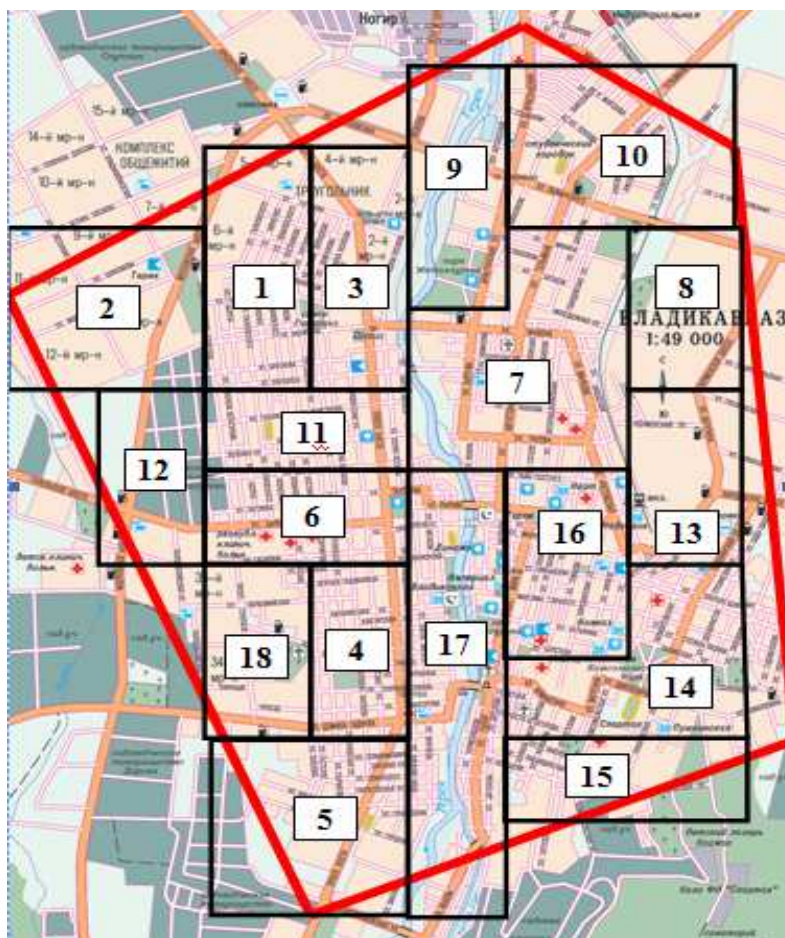


Рис. 9. Схема отбора проб на территории г. Владикавказа

Для этого были исследованы образцы почв, отобранные в осенний период 2012 г. В качестве контроля использовали почву (фон), отобранную вблизи поселения Гизель, расположенного в Пригородном районе Северной Осетии, в 9 км к западу от Владикавказа. Смешанные образцы почв и грунтов отобраны с 19 площадок с глубины 0-5 см (рис. 9).

Химический анализ опытных почвенных образцов показал, что в большинстве из них содержание валовых и подвижных форм Pb, Cu, Cd и Zn превышает значения ПДК (табл. 13).

Таблица 13

Содержание подвижных форм тяжелых металлов в почве, мг/кг

№ п/п	Никель	Свинец	Цинк	Кадмий	Медь
1	1,18 ± 0,26	51 ± 8,7	460 ± 129	3,8 ± 0,835	3,0 ± 0,508
2	1,19 ± 0,262	270 ± 45,8	800 ± 223	12,8 ± 2,82	4,4 ± 0,754
3	-	65 ± 11,1	840 ± 234	4,4 ± 0,971	-
4	1,42 ± 0,312	47 ± 7,921	550 ± 153	2,6 ± 0,574	2,5 ± 0,429
5	1,28 ± 0,282	11,3 ± 1,92	48 ± 13,4	0,44 ± 0,0968	1,9 ± 0,326
6	1,5 ± 0,323	200 ± 33,8	730 ± 204	6,7 ± 1,48	6,5 ± 1,1
7	2,0 ± 0,43	310 ± 52,4	1140 ± 321	11,3 ± 2,48	9,7 ± 1,65
8	1,04 ± 0,228	90 ± 32,4	620 ± 175	5,2 ± 1,14	3,9 ± 0,668
9	1,0 ± 0,388	36 ± 6,17	640 ± 178	2,4 ± 0,527	6,6 ± 1,12
10	1,29 ± 0,285	59 ± 10,1	560 ± 158	4,1 ± 0,909	4,8 ± 0,808
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	1,37 ± 0,301	22 ± 3,79	200 ± 54,9	3,7 ± 0,808	1,9 ± 0,323
14	1,31 ± 0,287	70 ± 12	540 ± 150	2,8 ± 0,619	2,6 ± 0,446
15	0,79 ± 0,307	1,8 ± 0,309	360 ± 102	0,46 ± 0,102	2,8 ± 0,473
16	1,27 ± 0,279	10,2 ± 1,74	54 ± 15,3	4 ± 0,851	0,54 ± 0,091
17	0,76 ± 0,298	41 ± 6,92	550 ± 154	2,4 ± 0,518	2,2 ± 0,375
18	1,23 ± 0,272	42 ± 7,09	510 ± 142	3,8 ± 0,835	2,8 ± 0,468
Фон	0,91 ± 0,354	5,0 ± 0,857	10,3 ± 2,87	0,29 ± 0,0638	0,66 ± 0,112
ПДК	4,0	6,0	23,0	ОДК = 0,5	3,0

Примечание: «-» – не определяли.

Для оценки уровня загрязнения почв можно использовать показатель ИПЗ – Z_c, равный сумме коэффициентов концентраций химических элементов (ГОСТ, 1986). Как видно из таблицы 14, допустимому уровню загрязнения отвечают только 2 пробы – с участков №№ 5 и 16, т.е. Z_c < 16, при котором наблюдается минимум функциональных отклонений.

Средний уровень загрязнения выявлен в образцах № 15 и 13 (умеренно опасный, где Z_c = 16 - 32). Высокий уровень загрязнения наблюдается

почти в половине проб. Многие образцы характеризуются большими значениями интегрального показателя загрязнения, который находится в пределах $Z_c > 64$ (опасное: $Z_c = 32 - 128$).

Наибольшее значение ИПЗ выявлено в пробе № 7. Данный участок расположен в центре города, недалеко от ЖД, что может играть немаловажную роль, т.к. от трения колес составов о рельсы в почвенный покров может попадать значительное количество поллютантов. Именно в седьмом квадрате расположено 4 крупнейших предприятия республики: ОАО «Кристалл», ОАО «Магнит», ОАО «Победит» и АО «Электроцинк». ОАО «Кристалл» изготавливает прокат из цветных металлов, производит спецтехоборудование; ОАО «Магнит» – крупное производственное предприятие, специализирующееся на выпуске литых магнитов; ОАО «Электроцинк» – один из крупнейших заводов в РФ по производству цинка, свинца, кадмия, серной кислоты, цинк-алюминиевых сплавов, полипропилена; ОАО «Победит» – производит продукцию из вольфрама и молибдена, а также рений.

Параллельно с химическим анализом почвенных образцов г. Владикавказа и определением ИПЗ проведено определение состояния альго-циано-микологических комплексов методом прямого учета данных групп МО под микроскопом (рис. 10).

Таблица 14

Интегральный показатель загрязнения почв и грунтов г. Владикавказа, у. е.

№ проб	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Значение ИПЗ	37,4	66,6	57,4	34,2	5,8	80,9	127,5	70,5	41,1	44,3
№ проб	11	12	13	14	15	16	17	18	фон	
Значение ИПЗ	59,6	124,0	19,5	33,2	29,2	5,5	39,7	35,2	2,5	

Примечание: допустимый уровень загрязнения $Z_c < 16$.

Максимальное количество водорослей (одноклеточных зеленых и диатомовых) наблюдается в первом образце (930 тыс. кл/г), что превышает значение в контроле в 9 раз. Есть варианты, где водорослей совсем не обнаружено, это пробы № 9, 12 и 15. Численность ЦБ существенно превосходит численность водорослей. Максимальное значение последних в про-

бе № 15 превышает контроль примерно в 2 раза и составляет 2100 тыс. кл/г. Фрагменты мицелия грибов встречаются во всех пробах: минимальное в образце № 11 – 30 тыс. кл/г, максимальное – 770 тыс. кл/г (№ 18) в районе с 2-мя автозаправочными станциями. Возможно, именно наличие продуктов нефтепереработки привело к увеличению количества микромицетов. В настоящее время установлено, что способность окислять углеводороды нефти не является специфической чертой отдельных видов грибов. Это не редкая их особенность, а одна из физиологических функций. Стимуляция нефтепродуктами размножения почвенных бактерий и грибов является позитивным фактором при биоремедиации почв, загрязненных НП (Евдокимова, 2014).

Количественные характеристики микробных комплексов зависят не только от содержания ТМ в почве, но и от природно-климатических условий, которые «смазывают» отклик от воздействия токсикантов. Так, например, в пробах отобранных вблизи русла реки, практически не обнаруживаются водоросли, количество грибов и ЦБ ниже, чем во многих других пробах. Это не говорит о токсичности среды, скорее всего это связано с отсутствием питательных веществ на каменистой поверхности берега.

В целом, полученные данные говорят о том, что разнообразие поллютантов приводит к пестрой картине развития микробных группировок.

В свою очередь, между количеством клеток водорослей и ИПЗ зависимости не установлено, коэффициент корреляции Пирсона составляет «-0,02».

Выявлено, что чем меньше интегральный показатель, тем выше численность клеток ЦБ в 1 г почвы (до ИПЗ 57 у.е.). В интервале от 57 до 300 у.е. зависимость противоположная: чем выше показатель ИПЗ, тем выше и численность клеток ЦБ. При этом коэффициент корреляции между ИПЗ и количеством клеток составляет 0,8, что говорит о достаточно высокой взаимосвязи между содержанием ТМ в почве и обилием ЦБ. При 300 у.е. численность ЦБ на единицу массы почвы падает.

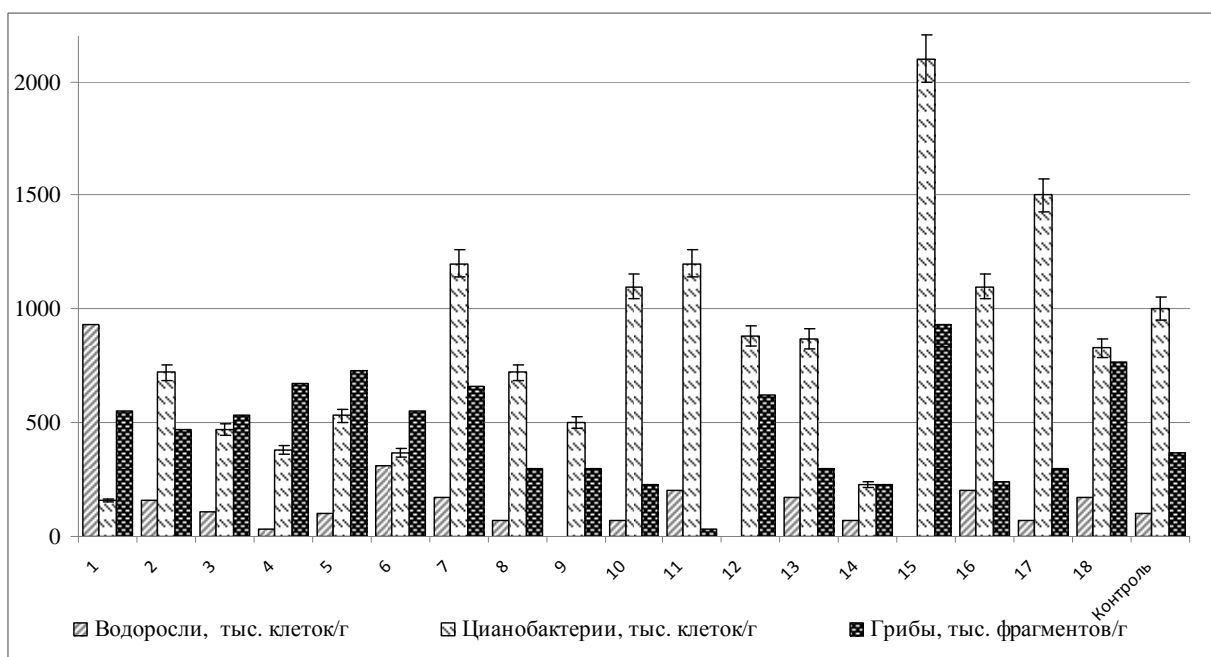


Рисунок 10. Групповой состав и численность МО в почвах г. Владикавказа

Между значениями ИПЗ и количеством грибов нет однозначных взаимосвязей (рис. 10). Для большинства проб наблюдается обратная зависимость между уровнем ИПЗ и обилием грибного мицелия: чем выше концентрация ТМ, тем меньше фрагментов мицелия в почве. Таким образом, микологический анализ показал, что все пробы почв и грунтов городской территории г. Владикавказа характеризуются большой степенью нарушенности и экологической напряженности, о чем свидетельствуют высокие значения интегральных показателей загрязненности.

В целом, анализы результатов микробиологического и альгологического анализов, проведенных с образцами почв и грунтов техногенных территорий, свидетельствуют как о возможности использования структурных особенностей альго-циано-микологических комплексов в процессах биодиагностики, так и о специфической устойчивости и адаптации отдельных группировок, в первую очередь, ЦБ и меланизированных грибов, развивающихся при пролонгированном, хроническом воздействии ТМ.

ГЛАВА IV. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МЕДИ И НИКЕЛЯ НА АЛЬГОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ ПОЧВЕННЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ПРИРОДНЫЕ БИОПЛЕНКИ

4.1. Изучение влияния ионов меди и никеля на цианобактерию

Nostoc linckia

4.1.1. Изменение биохемилюминесценции цианобактерии *Nostoc linckia* под влиянием меди

Одним из перспективных показателей для целей биоиндикации и биотестирования является интенсивность биохемилюминесценции веществ клеток некоторых организмов (Кудряшева и др., 2002; Пестова, 2007; Погосян и др., 2009).

БХЛ – это вид хемилюминесценции. Биолюминесценция основывается на химических процессах, при которых освобождающаяся энергия выделяется в форме света. Она возникает при многих химических реакциях, например, при рекомбинации свободных радикалов или в реакциях окисления. На основе знаний о БХЛ открывается путь исследования влияния токсикантов на культуру гетероцистных ЦБ. Молекулами ответственными за люминесценцию могут быть очень многие соединения, в том числе хлорофилл *a*, один из фотосинтетических пигментов и у ЦБ.

В работе была использована 2-х месячная культура ЦБ *N. linckia* Born and Flah. № 271, а токсикантом являлась соль Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Эксперимент включал несколько этапов: определение оптимального для биотестирования титра ЦБ, исследование чувствительности культуры при концентрациях ионов меди, близких к значению ПДК, реакцию ЦБ в более широком временном диапазоне и диапазоне концентраций.

Оптимальный титр для биотестирования определяли для культуры *N. linckia* в присутствии Cu^{2+} с концентрацией 2 мг/дм³. Продолжительность контакта составляла 12 часов. Для исследования брали суспензии с титрами $1,22 \cdot 10^9$; $0,61 \cdot 10^9$; $0,31 \cdot 10^9$; $0,15 \cdot 10^9$; $0,08 \cdot 10^9$ кл./мл. Контроль – варианты

с аналогичным титром, но без добавления соли меди. По окончании опыта определяли содержание хлорофилла *a* и интенсивность БХЛ.

Для выявления реакции культуры в областях концентрации токсиканта, близких к ПДК (0,1 мг/дм³), в культуру ЦБ с титром, определенным в предыдущем опыте, добавляли раствор CuSO₄ так, чтобы концентрация ТМ составляла 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 мг/дм³. Затем расширили область концентраций токсиканта и экспериментировали с различным временем экспозиции. Время экспозиции культуры *N. linckia* с ионами меди (II) составило 12 и 24 ч, а концентрации Cu²⁺ – 0,1; 1; 10 мг/дм³.

Таблица 15

Влияние титра цианобактерии *Nostoc linckia* на интенсивность биохемилюминесценции

Титр, ·10 ⁹ кл/мл	Интенсивность биохемилюминесценции, J (мВ)	
	Без токсиканта	С токсикантом
1,22	2310 ± 48	2128 ± 151
0,61	2286 ± 51	1751 ± 176
0,31	2367 ± 56	776 ± 91
0,15	1869 ± 67	486 ± 8
0,08	1503 ± 80	726 ± 38

Примечание: жирным шрифтом выделен выбранный оптимальный титр для исследования.

Результаты эксперимента показали, что при титре 0,08·10⁹ кл./мл происходит усиление БХЛ, что может маскировать проявление токсического эффекта при биотестировании. При высоких титрах отсутствует закономерность в вариантах без добавления ТМ (табл. 15), коэффициент корреляции между количеством клеток и биохемилюминесценцией составляет всего R=0,63. Скорее всего, такое явление связано с затруднением фиксации излучения прибором от всех возможных источников в суспензии, так как высокая плотность раствора препятствует фиксации излучения от глубоких клеток. В присутствии токсиканта количество живых, люминесцирующих клеток, уменьшается. Поэтому эффект «заслонения» ниже и зави-

симось от титра выражена сильнее. Такой эффект затрудняет использование культур с высоким титром в целях биотестирования.

Интенсивность БХЛ оказалась менее показательна в контрольных вариантах, чем содержание хлорофилла у *N. linckia*. Содержание хлорофилла в контроле точно коррелирует с количеством клеток в растворе ($R=0,99$). С уменьшением титра клеток – уменьшается содержание хлорофилла (рис. 11). Коэффициент корреляции Пирсона между содержанием хлорофилла *a* и БХЛ в контрольных вариантах составляет 0,73. Таким образом, было выявлено, что самым подходящим для работы титром является $0,15 \cdot 10^9$ кл./мл.

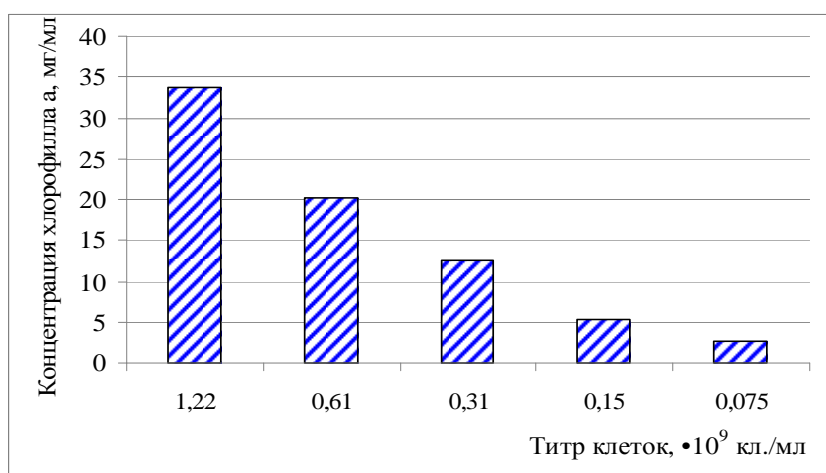


Рисунок 11. Содержание хлорофилла *a* в культуре *Nostoc linckia* при различном титре клеток

В области концентраций ионов меди от 0,1 до 1,0 мг/дм³ в культуре *N. linckia* не обнаружено четкой зависимости интенсивности БХЛ от концентрации ТМ (табл. 16).

Таблица 16

Влияние концентрации меди (II) на интенсивность биохемилюминесценции культуры *Nostoc linckia*

Концентрации ионов меди (II), мг/дм ³	Интенсивность биохемилюминесценции, J (мВ)	
	Без токсиканта, J (мВ)	С токсикантом, J (мВ)
0,1	1869 ± 67	1720 ± 49
0,2		995 ± 5
0,4		2009 ± 14
0,8		1507 ± 13
1,0		2021 ± 36

Так, концентрация 0,2 мг/дм³ оказалась токсичней, чем более высокие концентрации ионов Cu²⁺, а при концентрации 0,4 и 1,0 мг/дм³ происходит увеличение интенсивности БХЛ. Коэффициент корреляции в данном опыте между концентрацией ТМ и интенсивностью БХЛ составляет 0,42. Вероятно, невысокое содержание Cu²⁺ в среде не является показателем, который может рассматриваться в качестве объективной оценки уровня загрязнения.

В следующем опыте был использован более широкий диапазон концентраций (0,1; 1,0; 10 мг/дм³), в том числе с разным временем экспозиции ТМ – 12 и 24 ч.

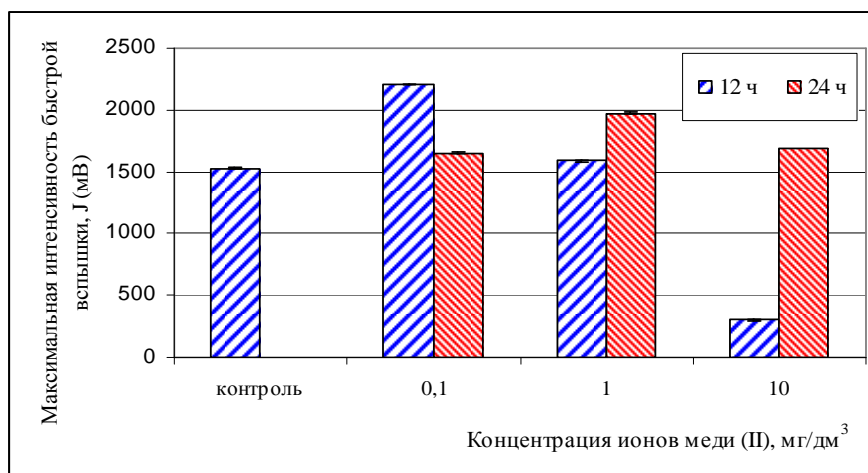


Рисунок 12. Влияние продолжительности контакта с токсикантом и его концентрации на биохемилюминесценцию *Nostoc linckia*

Проследить общее уменьшение БХЛ можно по данным через 12 ч, где значение этого показателя планомерно уменьшается с увеличением концентрации ТМ (рис. 12). Полученные результаты подтверждаются и коэффициентом корреляции, равным 0,99.

Суточное воздействие Cu²⁺, вероятно, влияет на фенотипическую адаптацию ЦБ к неблагоприятным для них условиям обитания. Так, ТМ влияют на популяцию ЦБ, а именно на состояние метаболического обмена, который дает возможность клеткам перестраивать внутреннее функционирование клеток (Гапочка, 1999). В нашем случае адаптация выражается в большем свечении фотосинтетиков по истечении 24 ч по сравнению с 12 ч

воздействием. Так, средний уровень свечения через 24 ч выше, чем через 12 ч (рис. 11). В целом, общий уровень свечения ЦБ выше, чем в контроле.

Таким образом, можно сделать следующие выводы: 1. Отклик в виде интенсивности БХЛ у ЦБ *N. linckia* на действие Cu^{2+} неоднозначен. Важным условием является время воздеситвия токсиканта. Однако, определение БХЛ – это уникальная возможность изучения функционирования систем фотосинтезирующих МО, а в сочетании с другими показателями – основа для выявления маркеров функционирования на биохимическом и популяционном уровне. 2. Показано, что при определении БХЛ необходимо учитывать титр МО, так как при высоких титрах проявляется «эффект заклонения», а при низких титрах и низких концентрациях токсиканта – увеличение интенсивности вспышки, что может скрадывать результат биотестирования. 3. При отработке системы биотестирования необходимо учитывать особенности конкретных культур почвенных ЦБ. 4. Реакция на ТМ обусловлена не только откликом каждой отдельной клетки, но и поведением популяции в стрессовых ситуациях.

4.1.2. Влияние ионов никеля и нефтепродуктов на состояние цианобактерии *Nostoc linckia*

4.1.2.1. Определение жизнеспособности клеток цианобактерии

При определении жизнеспособности клеток ЦБ *N. linckia* в качестве поллютантов использованы Ni в виде соли ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и нефтепродукты (НП) – смазочная охлаждающая жидкость «Алтек» (этиленгликоль, пропиленгликоль, бура техническая, 3-этаноламин) в концентрациях 2 и 20 мг/дм³, а также их смесь. Выбор данных поллютантов обусловлен тем, что они являются одними из основных компонентов сточных вод машиностроительных предприятий, где есть гальванические цеха. В концентрации 20 мг/дм³ они обычно поступают для внутренней очистки на предприятии.

Показано, что *N. linckia* по-разному реагирует на действие испытуемых поллютантов. Так, внесение Ni и Ni + НП в питательную среду при-

водит к существенному замедлению роста ЦБ по сравнению с контролем. Численность клеток в этих вариантах составляет всего от 3,5 % до 8,3 % по сравнению с контролем. Но с внесением НП титр ЦБ составляет 56,8 и 84,4% в зависимости от концентрации НП (табл. 17). За время экспозиции численность клеток в популяции ЦБ в контрольном варианте выросла более, чем в 35 раз; под влиянием НП (2 и 20 мг/дм³) – в 20 и 29 раз соответственно, тогда как в присутствии Ni (2-5 варианты) численность клеток увеличивалась очень незначительно – от 1,2 до 2,9 раза по сравнению с первоначальным значением. Таким образом, был выявлен сильнейший ингибирующий эффект Ni на интенсивность размножения испытуемой ЦБ.

Таблица 17

Влияние поллютантов на интенсивность роста культуры *Nostoc linckia*

Вариант, доза токсиканта, мг/дм ³	Титр клеток, ·10 ⁶	Снижение титра, % к контролю
Контроль	250,0±0,44	
2 Ni ²⁺	8,8±1,40	3,5
20 Ni ²⁺	18,8±4,0	7,5
2 Ni ²⁺ + 2 НП	10,0±2,5	4,0
20 Ni ²⁺ + 20 НП	20,8±2,52	8,3
2 НП	141,9±18,4	56,8
20 НП	206,0±32,4	82,4

Определение жизнеспособности клеток данной ЦБ методом ТТХ показало, что высокие концентрации Ni при сохранении внешней структуры клеток приводят к почти полной гибели популяции ностока (табл. 18).

Таблица 18

Влияние поллютантов на жизнеспособность клеток *Nostoc linckia*, %

Вариант, доза токсиканта, мг/дм ³	Клетки	
	Живые	Мертвые
Контроль	96,48±4,32	3,52
2 Ni ²⁺	83,53±15,4	16,47
20 Ni ²⁺	2,94	97,06±2,72
2 Ni ²⁺ + 2 НП	88,21±5,2	11,79
20 Ni ²⁺ + 20 НП	2,27	97,73±1,96
2 НП	89,6±8,6	10,4
20 НП	89,67±7,8	10,33

Пересчет титра клеток с учетом их жизнеспособности показывает, что Ni токсичен для данного вида ЦБ: с увеличением концентрации возрастает ингибирующий эффект (табл. 19).

Таблица 19

Титр клеток *Nostoc linckia* с учетом их жизнеспособности

Вариант, доза токсиканта, мг/дм ³	Титр клеток ($\cdot 10^6$) в 1 мл
Контроль	241,2
2 Ni ²⁺	7,35
20 Ni ²⁺	0,55
2 Ni ²⁺ + 2 НП	8,82
20 Ni ²⁺ + 20 НП	0,47
2 НП	127,14
20 НП	184,72

4.1.2.2. Изменение физиологических процессов *Nostoc linckia* под действием токсикантов

Определение таких показателей функционирования клеток *N. linckia*, как ПОЛ, содержание хлорофилла *a*, поглощение Ni и НП выявило существование изменения в протекании физиологических процессов у исследуемой культуры. Так, количество хлорофилла *a* по сравнению с контролем снижается во всех вариантах (рис. 13). Наибольшее снижение наблюдается в случаях внесения Ni в любых концентрациях и Ni + НП.

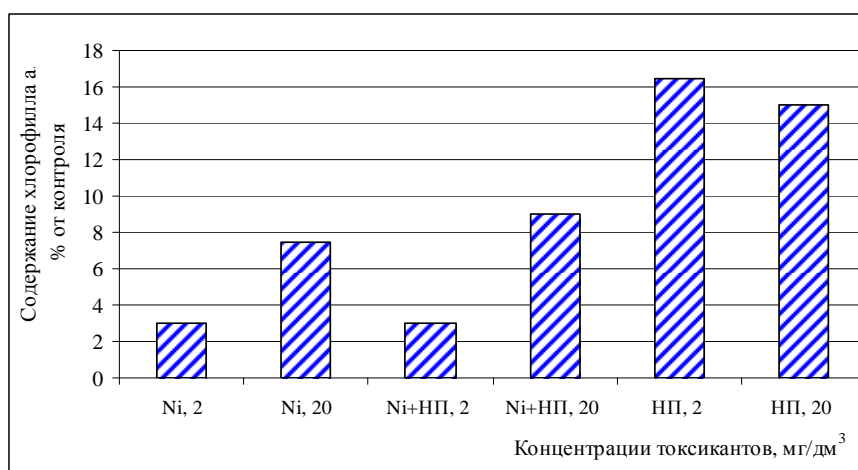


Рисунок 13. Содержание хлорофилла *a* в культуре *Nostoc linckia* при внесении токсикантов, в % от контроля

Сравнение результатов по снижению титра клеток ЦБ и содержания в них хлорофилла *a* в присутствии Ni показывает их практическую тожде-

ственность (табл. 18). Вероятно, разрушение фотосинтезирующего пигмента под действием Ni становится одной из причин гибели популяции ЦБ.

Изучение действия стрессовых факторов на антиоксидантные системы фотосинтезирующих МО, в частности, эукариотных водорослей показывает, что могут наблюдаться следующие изменения в структуре и функционировании клетки: вздутие тилакоидов, аккумуляция липидных глобул, увеличение содержания веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и H_2O_2 , возрастание содержания глутатиона (Tian Jiuan, Yu Juan, 2009).

Таблица 18

Снижение численности клеток *Nostoc linckia* и содержания в них хлорофилла а под действием никеля, % к контролю

Вариант, доза токсиканта (мг/дм ³)	Титр клеток	Содержание хлорофилла а
2 Ni ²⁺	3,5	3,0
20 Ni ²⁺	7,5	7,5
2 Ni ²⁺ + 2 НП	4,0	3,0
20 Ni ²⁺ + 20 НП	8,3	9,0

В наших опытах с прокариотными фотосинтетиками установлено, что под влиянием никеля и НП происходит возрастание интенсивности окислительных процессов и содержание МДА (рис. 14).

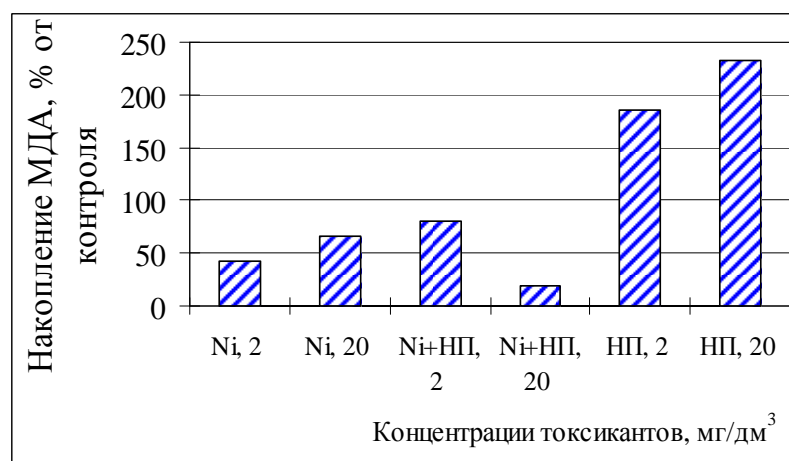


Рисунок 14. Накопление МДА в культуре *Nostoc linckia* под влиянием никеля и нефтепродуктов, % от контроля

В большей степени возрастание ПОЛ вызывают НП, скорее всего, это связано с особенностями химического состава НП и направленности про-

цессов их биодеструкции. Так, входящие в состав НП углеводороды, этиленгликоль и пропиленгликоль подвергаются биотрансформации, которая прежде всего идет по пути окисления. Нередко в ходе окислительной деструкции токсикантов образуются активные промежуточные продукты, которые инициируют образование активных форм кислорода, вызывающих окислительное повреждение биологических молекул, в том числе и липидов (Юрин, 2002). Ранее было показано, что под влиянием таких поллютантов, как хлорид Na, ацетат Pb, сульфат Cu происходит активация процессов ПОЛ в культуре *N. linckia*. В большей степени возрастание интенсивности ПОЛ вызывал сульфат Cu (Огородникова и др., 2010).

Таблица 20

Остаточное содержание никеля и нефтепродуктов в культуральной жидкости *Nostoc linckia*

Вариант, доза токсиканта (мг/дм ³)	Метод определения		
	НП, ИВА*, мг/л	Ni, ИВА, мг/л	Ni, **ААС, мг/л
Контроль	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
2 Ni ²⁺	Не определяли	1,32±0,60	1,307±0,366
20 Ni ²⁺	0,04±0,01	Не определяли	Не определяли
2 Ni ²⁺ + 2 НП	0,14±0,04	1,38±0,62	1,175±0,329
20 Ni ²⁺ + 20 НП	Не определяли	11,75±2,29	8,225±2,333
2 НП	0,15±0,04	Не определяли	Не определяли
20 НП	0,88±0,22	11,13±2,67	9,150±2,521

Примечание: *ИВА - инверсионный вольтамперометрический анализ; **ААС - атомно-абсорбционный метод.

Установлено, что за 14 суток экспозиции почвенной ЦБ *N. linckia* в загрязненной среде содержание токсикантов в культуральной жидкости существенно изменилось (табл. 20). При определении содержания Ni впервые сравнивали 2 метода его обнаружения: ИВА и ААС. Выявлено, что методы дают тождественные результаты. Расхождения в результатах объясняются тем, что для метода ИВА приемлемы низкие концентрации, поэтому перед анализом исследуемые растворы разлавливались в 250 раз. При разбавлении неизбежна ошибка анализа, чем и объясняется некоторая разница результатов анализа двумя методами (Выдра и др., 1980).

Тем не менее, прослеживается определенная тенденция в поведении ЦБ на поглощение ТМ из культуральной среды - чем выше первоначальная концентрация токсиканта, тем полнее его связывание биомассой ЦБ и, соответственно, извлечение из среды (табл. 21).

Таким образом, уровень биосорбции токсикантов из жидкой среды ЦБ *N. linckia* может достигать почти 60%. Учитывая, что культура ЦБ первоначально развивалась в загрязненной среде, реально предположить, что уровень биосорбции может быть существенно выше, если биомассу ЦБ, выращенную без добавления токсикантов, использовать в качестве фильтра, пропуская через нее загрязненную жидкость.

Таблица 21

Уровень извлечения никеля из культуральной жидкости *Nostoc linckia*, %

Вариант, доза токсиканта (мг/дм ³)	Метод ИВА	Метод ААС
2 Ni ²⁺	34,0	34,65
20 Ni ²⁺	41,25	58,87
2 Ni ²⁺ + 2 НП	31,0	41,25
20 Ni ²⁺ + 20 НП	44,35	54,25

Таким образом, исходя из изученных результатов ясно, что: 1. При культивировании ЦБ *N. linckia* в среде с добавлением Ni и НП происходят существенные изменения в количественных параметрах популяции, ее жизнеспособности, содержания хлорофилла *a* и величины ПОЛ. 2. Из двух испытанных токсикантов Ni обладает более репрессивным действием. 3. Благодаря высокому уровню сорбционной активности *N. linckia* к Ni и НП данный штамм ЦБ можно рассматривать как перспективный объект для разработки методов цианобактериальной очистки жидкостей от токсикантов.

4.1.3. Количественное определение формазана в клетках цианобактерии *Nostoc linckia* при действии меди (II) и никеля (II)

Один из методов, используемых нами для оценки уровня загрязнения среды, – это метод ТТХ, который заключается в том, что в качестве мар-

керных признаков жизнеспособности клеток выбирается показатель образования в клетках кристаллов формазана красного цвета из бесцветного ТТХ. Однако тетразольно-топографический метод, давая представление о соотношении живых и мертвых клеток в популяции цианобактерий при действии загрязняющих веществ, не дает количественной оценки содержания формазана, который накапливается в живых клетках после проведенных реакций. В то же время именно концентрация формазана, вероятно, будет являться наиболее объективной характеристикой устойчивости тест-организма к внешнему воздействию. Поэтому в опыте одновременно использовано 2 метода: тетразольно-топографический и спектрофотометрический.

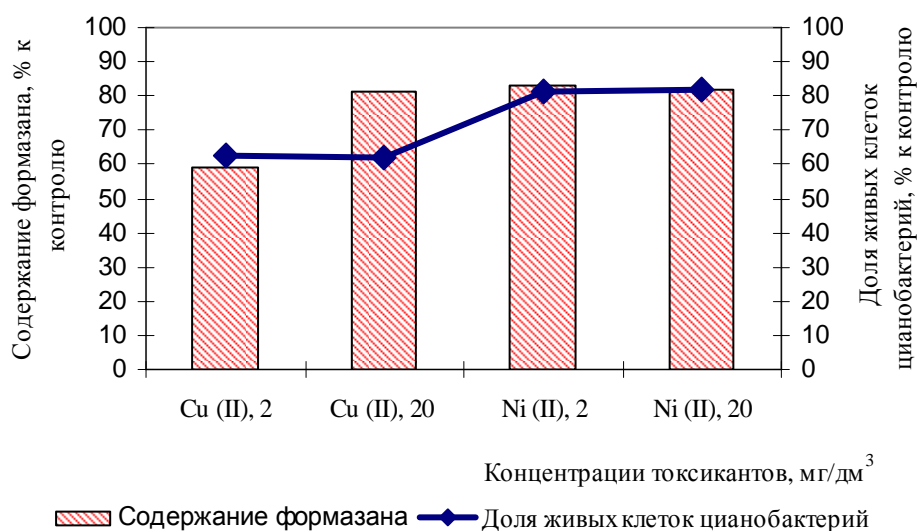


Рисунок 15. Влияние ионов никеля и меди на жизнеспособность клеток *Nostoc linckia* в накоплении формазана

В данном опыте использована культура ЦБ *N. linckia*. В качестве поллютанта – соли Cu и Ni с концентрацией 2 и 20 мг/дм³. Титр штамма в исследовании составлял $1,6 \cdot 10^8$ кл./мл (Огородникова и др., 2013).

При определении жизнеспособности клеток методом ТТХ было установлено, что возрастание концентрации ТМ практически не влияет на жизнеспособность клеток, вероятно, это связано с высоким титром исследуемого штамма (рис. 15). Cu^{2+} более токсичен для ЦБ по сравнению с Ni^{2+} .

При количественном определении формазана в культуре почвенных ЦБ показано, что под влиянием ТМ происходило его снижение от 20 до 40% по сравнению с контролем (рис. 15). Выявлена тесная корреляция между результатами по оценке токсичности ТМ для ЦБ, полученными разными методами ($R=0,82$). В целом, при использовании ЦБ в качестве тест-организмов для оценки степени загрязнения ОС ТМ правомочно применение обоих методов: определение жизнеспособности клеток методом ТТХ и количественное определение формазана (Глава II).

Таким образом, эксперименты показывают, что чистые культуры ЦБ можно использовать для определения степени загрязнения ОС ТМ.

4.1.4. Особенности накопления ионов меди (II) и никеля (II) в различных фракциях гомогената клеток цианобактерии *Nostoc linckia*

Исследование особенностей динамики накопления ионов ТМ в некоторых фракциях клеток МО позволяет выявить закономерности, с помощью которых можно сделать обоснованные выводы о механизмах адаптации ЦБ, спрогнозировать и объяснить специфику их использования и при этом не проводить «вслепую» множество опытов, моделирующих условия области применения (Розенцвет и др., 2010; Лялина и др., 2014).

Так как миграция металлов из клетки в культуральную жидкость и обратно происходит через клеточную мембрану, а усиление выхода электролита часто связывают с ее повреждением, то данные по выходу электролита из клеток информативны. Эти данные помогут ответить на такие вопросы: связано ли поступление токсикантов с нарушением нормального функционирования клеточной стенки МО, с ее повреждением? Связаны ли изменения удельного поглощения некоторыми фракциями с изменениями значений выхода электролита из клеток ЦБ? В этой серии опытов исследовали влияние ТМ на ЦБ *N. linckia* в виде гомогената и в виде пленки.

Результаты по содержанию Ni^{2+} и Cu^{2+} в различных фракциях гомогената клеток *N. linckia* представлены в таблице 22. Через 1 сутки выявлено, что никель накапливается в лиофобных фракциях клеток культуры *N. linckia*, причем в варианте 2 Ni в большей степени, чем в варианте 20 Ni. ТМ не обнаружен в лиофильной фракции клеток варианта 2 Ni, а в варианте 20 Ni найден. Значения суммарных количеств ионов Ni^{2+} внутри клетки обоих вариантов близки между собой.

Таблица 22

Содержание тяжелых металлов ($\cdot 10^{-3}$, мг/дм³) в различных фракциях клеток *Nostoc linckia* и суммарная степень извлечения металлов из раствора, %

Вариант*	Через 1 сутки				Через 14 суток			
	Спирт	ЧХУ	ЭДТА	Степень извлечения	Спирт	ЧХУ	ЭДТА	Степень извлечения
2 Ni^{2+}	<<	9,62 ± 0,48	<<	1,86 ± 0,09	1,83 ± 0,11	9,21 ± 0,48	<<	2,11 ± 0,11
20 Ni^{2+}	2,83 ± 0,14	5,12 ± 0,26	<<	1,53 ± 0,08	3,97 ± 0,24	4,81 ± 0,30	<<	1,73 ± 0,09
2 Cu^{2+}	2,56 ± 0,13	1,05 ± 0,05	4,18 ± 0,21	1,52 ± 0,07	<<	1,47 ± 0,03	7,84 ± 0,39	1,82 ± 0,08
20 Cu^{2+}	17,23 ± 0,86	2,51 ± 0,13	94,0 ± 4,7	21,87 ± 1,09	0,94 ± 0,08	2,83 ± 0,14	520,0 ± 5,1	100 ± 5

Примечание: «*» – согласно концентрации ионов металлов в растворе мг/дм³; «<<<» – менее предела обнаружения; «ЧХУ» – четыреххлористый углерод.

Через 1 сутки выявлено, что никель накапливается в лиофобных фракциях клеток культуры *N. linckia*, причем в варианте 2 Ni в большей степени, чем в варианте 20 Ni. Металл не обнаружен в лиофильной фракции клеток варианта 2 Ni, а в варианте 20 Ni найден. Значения суммарных количеств ионов Ni^{2+} внутри клетки обоих вариантов близки между собой.

В экстракте с ЭДТА ионов никеля не обнаружено на протяжении всего эксперимента. По сравнению с Ni, ионы Cu^{2+} обнаружены в лиофильной фракции уже через 1 сутки в вариантах 2 Cu и 20 Cu, в большем количестве там, где концентрация ТМ в растворе выше. Это может быть связано с токсичностью раствора. По мере увеличения токсичности возрастает количество ионов, связанных лиофильными компонентами клеток и соотношение между содержанием Cu^{2+} и Ni^{2+} в лиофильной фракции и содержанием в лиофобной фракции (табл. 23) в направлении: 2 Ni > 20 Ni > 2 Cu > 20 Cu.

Соотношение между содержанием ионов меди (II) и никеля (II) в лиофильной и лиофобной фракциях клеток

Вариант *	Через 1 сутки	Через 14 суток
	Соотношение спирт/ЧХУ	Соотношение спирт/ЧХУ
2 Ni ²⁺	<</9,62	0,20
20 Ni ²⁺	0,55	0,83
2 Cu ²⁺	2,43	<</1,47
20 Cu ²⁺	6,87	0,33

Примечание: «*» – согласно концентрации ионов металлов в растворе, мг/дм³; «ЧХУ» – четыреххлористый углерод; «<<<» – величина значения стремится к нулю.

В течение 1-х суток ТМ вызывают увеличение выхода электролита: чем выше концентрация ионов ТМ, тем больше выход электролитов. Выход электролита из клеток ЦБ, подверженных действию сульфатов Cu и Ni, увеличивается в том же направлении, что и при увеличении концентрации токсикантов в лиофильной фракции (табл. 23), коэффициент корреляции составляет 0,95 для гомогената и 0,97 для биопленки.

В первых 3-х (2 Ni²⁺, 20 Ni²⁺, 2 Cu²⁺) вариантах (табл. 22) значения суммарного содержания ТМ во фракциях близки между собой. В варианте, где концентрация Cu равна 20 мг/дм³, внутриклеточное содержание ТМ выше и может быть обусловлено существенным нарушением защитных функций клеточной стенки, что подтверждается высоким значением, по сравнению с другими вариантами, выхода электролита (табл. 24).

Выход электролита в вариантах с гомогенатом сильнее, чем в вариантах с пленкой. Гомогенат отличается по строению от биопленки тем, что состоит из отдельных клеток и разобщенных между собой обрывков цепочек ЦБ. Биопленка представляет из себя совокупность переплетающихся в «псевдоткань» нитей ЦБ. Таким образом, при переплетении нитей образуется структура, имеющая верхние и внутренние слои. В состоянии гомогената количество клеток, с которыми контактирует раствор ТМ стремится к 100%, а в состоянии пленки непосредственному действию подвержены только клетки наружных слоев, поэтому суммарное повреждение клеток меньше. Выход электролита из клеток ЦБ, находящихся в виде пленки,

меньше, что указывает на меньшее повреждающее действие ТМ. Возможно, объяснением этому является форма нахождения культуры в растворе. У гомогената «захват» ТМ больше за счет большей площади соприкосновения культуры с раствором, у пленки – площадь соприкосновения меньше, соответственно, и количество захваченных ионов за первые сутки меньше, поэтому при кипячении в раствор из гомогената ионов выходит больше, чем из пленки.

Таблица 24

Влияние ионов никеля (II) и меди (II) *Nostoc linckia* на выход электролита из клеток цианобактерий, в % от контроля

Форма использования цианобактерий	1 сутки				14 суток			
	2 Ni ²⁺	2 Cu ²⁺	20 Ni ²⁺	20 Cu ²⁺	2 Ni ²⁺	2 Cu ²⁺	20 Ni ²⁺	20 Cu ²⁺
Гомогенат	112±11	175±18	175±8	275±28	89±37	89±17	111±22	117±34
Пленка	93±10	95±10	128±13	157±16	850±160	300±60	125±25	690±130

Через 14 суток содержание Ni²⁺ в лиофобной фракции практически не меняется, скорее всего, образуются достаточно устойчивые соединения. К концу опыта ионы Ni²⁺ появляются в лиофильной фракции варианта 2 Ni²⁺. При этом, чем выше концентрация ТМ в растворе, тем выше его содержание в указанной фракции.

Концентрация ионов Cu²⁺ в лиофобной фракции в течение 14 суток тоже практически не изменяется. Однако этот показатель резко уменьшается в лиофильной фракции и возрастает во фракции, выделяемой с поверхности клеток раствором ЭДТА. Данный факт указывает на выведение ионов из внутриклеточного пространства после адаптации культуры к ТМ. Снижается и выход электролита к концу опыта (у гомогената), значения во всех вариантах близки к контролю, что тоже свидетельствует об адаптации МО. Через 14 суток значения величин выхода электролита в вариантах, где на гомогенат ЦБ действуют раствором сульфата меди (II), снижаются почти в два раза и не имеют достоверных отличий с контролем. Существенно

возрастает выход в вариантах с биопленкой (табл. 24). Возможно, что выходу ионов металлов (Me^{2+}), поглощённых биопленкой, в раствор при обычных условиях препятствуют вышележащие слои нитей ЦБ. При кипячении происходит выход не только удерживаемых на поверхности пленки, но и «глубинных» Me^{2+} . В гомогенате такой структуры нет, поэтому разница в интенсивности потока ионов Me^{2+} от клеток ЦБ в водный раствор при обычных условиях и кипячении меньше в данном случае, чем в вариантах с биопленкой.

Таким образом, наши исследования доказали: 1. ЦБ накапливают ионы никеля и меди, что является предпосылкой использования культуры в качестве биосорбента, в первую очередь, для Cu. 2. Время контакта ЦБ с токсикантами не должно превышать 14 суток, содержание Me^{2+} за этот период во внутриклеточном пространстве уменьшается, и очистка загрязненных объектов будет менее эффективна. 3. Суммарное накопление ионов Cu в лиофильной и лиофобной фракциях выше, чем Ni, соответственно, и при очистке объектов ОС при одинаковых условиях удаление Cu пройдет более эффективно, чем Ni. 4. Исследование выхода электролита параллельно с распределением ионов Cu и Ni во фракциях клеток ЦБ дает дополнительную информацию, помогающую объяснить изменение количественных характеристик распределения. Выявлена высокая степень взаимосвязи между значениями выхода электролита и соотношением содержания ТМ в лиофильной фракции к их содержанию в лиофобной фракции.

4.2. Потенциал природных биопленок *Nostoc commune* как сорбентов тяжелых металлов в водной среде

Биопленки *N. commune* - природные многовидовые структурированные сообщества фототрофных и сапротрофных МО, обитающих в любом регионе планеты. Совокупность предполагаемых механизмов устойчивости микроорганизмов, входящих в состав биопленок, делает эти уникальные природные комплексы перспективным объектом в разработке методов

оценки состояния окружающей среды с проведением биоремедиационных мероприятий (Домрачева и др., 2007).

Целью данного опыта было исследование биоремедиационного и биотестового потенциала природных многовидовых биопленок с доминированием ЦБ *N. commune* по отношению к ионам Cu^{2+} и Ni^{2+} .

4.2.1. Самосборка природных биопленок с доминированием *Nostoc commune*

В последние десятилетия экспериментально доказано, что биопленки представляют особую форму существования сапротрофных бактерий. Сообщество микробных пленок характеризуется сложной структурой и разнообразными клеточными взаимодействиями. Даже в простой биопленке, состоящей из клеток одного вида, каждая клетка занимает определенную экологическую «микронису». Еще большей сложностью обладает структура природных биопленок, содержащих различные виды МО, которые взаимодействуют между собой, осуществляя кооперативное использование субстрата, межвидовой перенос электронов и др. процессы. Подобное «общественное» поведение бактерий получило название «чувство кворума» (quorum sensing). Чувство кворума позволяет бактериям на популяционном уровне регулировать поведение и отвечать на изменения в ОС. Большинство процессов, регулируемых с помощью чувства кворума, осуществляются не единичными клетками, а по достижении определенной плотности популяций. Таким образом, возникает некий аналог многоклеточного организма (Costerton, 1995; Gross, 2002; Waters, Bassier, 2005).

Доказательством морфологической и функциональной целостности биопленок было обнаружение явления самосборки (Раилкин, 1994). При разрушении природных сообществ МО, состоящих из водорослей, бактерий и одноклеточных животных, механически удаленных из природных местообитаний, наблюдалось восстановление топической и трофической структуры. Самосборка микрообрастаний из суспензии клеток в лабора-

торных условиях на дне чашки Петри завершалась за 24 часа. Качественный и количественный состав полученного в лаборатории сообщества почти не отличался от состава природных сообществ.

К числу наиболее древних микробных разрастаний относятся биопленки из ЦБ, которые свыше 3 млрд лет распространены в самых разных биотопах Земли. Они могут выживать более 50 лет без воды и представляют собой своеобразную «дышащую кожу» Земли (Levit et al., 1999).

Среди безусловных цианобактериальных доминантов-космополитов, формирующих биопленки в любых регионах планеты, выделяется *N. commune* – вид, способный вступать в многообразие консортивных связей с другими ЦБ, водорослями, бактериями, грибами и беспозвоночными, а также обладающий высокой сорбционной способностью по отношению к ряду поллютантов, в частности, к ТМ (Штина, Голлербах, 1976; Патова и др., 2000; Закирова, 2006; Домрачева, Кондакова, 2007). Данные биопленки представляют собой классические, длительно существующие микробные экосистемы с определенным складом трофических отношений и протеканием сезонных и аутогенных сукцессий (Домрачева и др., 2009).

Для исследования использованы биопленки с доминированием *N. commune*, которые были собраны у железной дороги в г. Дзержинске Нижегородской области. Определяли качественный состав биопленки, количественный и групповой состав МО путем прямого микроскопического учета микроорганизмов в гомогенизированной биопленке. Чтобы изучить возможность разрушенного сообщества к самосборке, оставшуюся после микроскопирования суспензию клеток вносили в чашки Петри со стерильным песком.

Комплекс фототрофов материнской биопленки представлен 9 видами, из которых 2 вида относятся к гетероцистным азотфиксирующим ЦБ, 6 – к безгетероцистным ЦБ и 1 – зеленая водоросль (табл. 25).

Видовой состав фототрофного комплекса *Nostoc commune*

Группы фототрофов	Виды
Гетероцистные ЦБ	1. <i>Nostoc commune</i>
	2. <i>Nostoc punctiforme</i>
Безгетероцистные БГЦ ЦБ	3. <i>Phormidium autumnale</i>
	4. <i>Ph. molle</i>
	5. <i>Ph. uncinatum</i>
	6. <i>Plectonema nostocorum</i>
	7. <i>Leptolyngbya fragilis</i>
	8. <i>L. foveolarum</i>
Одноклеточные зеленые водоросли	9. <i>Chlorella murabilis</i>

Плотность организмов в данном сообществе чрезвычайно велика и составляет около 2 млрд клеток в 1 г сухой биопленки, при этом более 80 % приходится на долю доминанта (табл. 26).

Фототрофный комплекс в природной и восстановленной биопленках
Nostoc commune

Группы фототрофов	Природная биопленка		Восстановленная биопленка	
	Численность, кл./г ($\cdot 10^9$)	Содержание (%)	Численность, кл./г ($\cdot 10^7$)	Содержание (%)
<i>N. commune</i>	1,61±0,21	81,64	2,527±0,083	85,16
Другие ГЦ ЦБ	0,05±0,01	2,53	0,078±0,004	7,88
БГЦ ЦБ	0,21±0,019	10,85	0,232±0,014	2,65
Одноклеточные зеленые водоросли	0,10±0,015	4,98	0,127±0,02	4,31
Всего	1,970±0,100	100,00	2,264±0,121	100,00

Примечание: «ГЦ ЦБ»-гетероцистные цианобактерии; «БГЦ ЦБ» - безгетероцистные цианобактерии.

При размножении в природных или лабораторных условиях неповрежденных биопленок дочерние колонии начинают формироваться на материнской в виде маленьких шариков, которые отслаиваются и заселяют новые территории. При заселении субстрата из гомогенизированной массы пленок (суспензии одиночных клеток и нитей) формирование биопленок пошло по другому пути: поверхность песка затягивалась налетом фототрофов, которые, в отличие от материнской колонии *N. commune*, невозможно отделить от субстрата. Поэтому в дальнейшем количественный учет МО проводили не на 1 г биопленки, а на 1 см² «цветущего» песка (табл. 26). При невозможности прямого сравнения конкретных результатов количест-

венного учета фототрофов в двух типах биопленок, тем не менее, можно легко сравнить результаты, характеризующие структуру данных сообществ (табл. 26, рис. 16).

Анализ структурных особенностей материнской и восстановленной биопленок показывает, что и в дочерней биопленке доминирование сохраняется за *N. commune*, причем в дочерней пленке степень его доминирования даже возрастает. Полностью сохраняет свою позицию одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella murabilis*. Но изменяется представительство других гетероцистных форм ЦБ (в сторону возрастания) и безгетероцистных их форм (в сторону снижения долевого участия). В целом соотношение между азотфиксирующими и безгетероцистными формами в исходной и восстановленной пленках меняется несущественно (92,87% к 7,13% – в материнской; 94,85% к 5,15% – в дочерней). Все выявленные изменения в структуре дочерней биопленки столь невелики, что можно постулировать доказанным процесс самосборки биопленки *N. commune* из механически разрушенного сообщества.

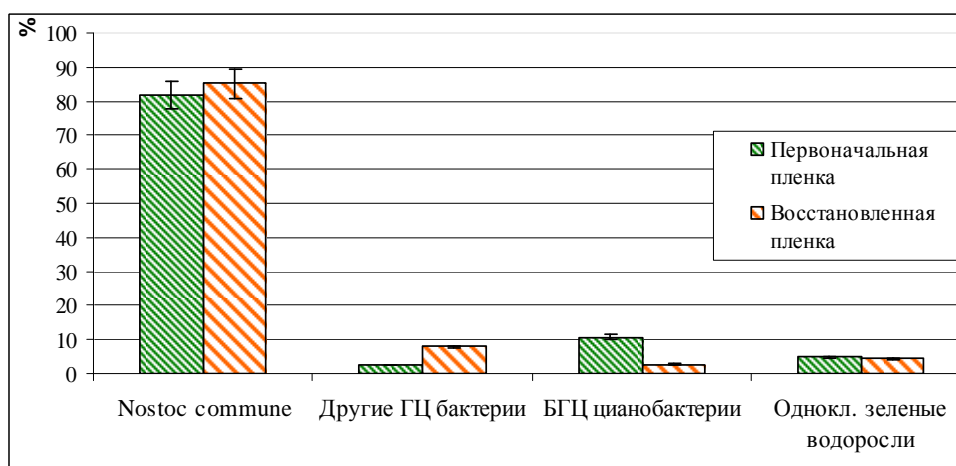


Рисунок 16. Структура фототрофных комплексов в материнских и дочерних биопленках с доминированием *Nostoc commune*

Наличие поверхностных микробиологических пленок имеет еще один экологический аспект, связанный как с выделением клетками слизи, так и массовым размножением нитчатых и мицелиальных форм. Доказано, что в результате развития биопленок увеличивается устойчивость почвенных аг-

регатив, сетчато-нитчатая цианобактериальная структура скрепляет почвенные частицы и играет определенную противозерозионную роль (Дубовик, 1995; Malam et al., 2001).

Таблица 27

Длина нитей фототрофных комплексов в биопленках *Nostoc commune*

Группы фототрофов	Длина нитей фототрофного комплекса природной биопленки, м/г	Длина нитей фототрофного комплекса восстановленной биопленки, м/см ²
<i>Nostoc commune</i>	8050	126
Другие ГЦ ЦБ	150	2
БГЦ ЦБ	630	7
Всего	8830	135

Примечание: «ГЦ ЦБ»-гетероцистные цианобактерии; «БГЦ ЦБ» - безгетероцистные цианобактерии.

Данные, приведенные в таблице 27, показывают, что длина нитей фототрофных комплексов в природной и восстановленной биопленках *N. commune* чрезвычайно велика и достигает ок. 9 км/г природной пленки и свыше 100 м/см² – восстановленной.

Существенную роль в агрегации биопленок и скреплении с частицами почвы имеет также мицелий микромицетов, длина которого превышает 2 км на 1 г или на 1 см² биопленки (табл. 28). При этом, если в материнской биопленке вклад микромицетов в формировании сетчато-мицелиальной структуры составляет всего 22%, то в восстановленной биопленке – 94,1%.

Таблица 28

Соотношение нитчатых и мицелиальных форм мицелия в биопленках *Nostoc commune*

Биопленки	Длина нитей цианобактерий	Длина мицелия	Суммарная длина нитей и мицелия
Природная, м/г	8830	2489	11319
Восстановленная, м/см ²	135	2151	2286

Таким образом, природные биопленки с доминированием *N. commune* – это многовидовые структурированные сообщества с большой плотностью клеток организмов разных таксономических групп, обладающие высокой способностью к самосборке при их механическом разрушении. Впервые показано, что во вновь образованных пленочных структурах при относи-

тельно сбалансированном участии фототрофных партнеров существенно повышается ценозоообразующая роль микромицетов.

4.2.2. Исследование видового, группового состава и содержания тяжелых металлов в биопленках из различных экотопов

Изучение видового состава биопленок, отобранных в разных экотопах (автодорога – АД и железная дорога – ЖД), показало, что наибольшее представительство различных видов ЦБ и водорослей характерно для биопленок, отобранных вблизи АД, и составляет 23 вида (Приложение, табл. 1). В биопленке у ЖД выявлено всего 10 видов фототрофов. Полностью исчезают эукариотные водоросли. Вероятно, это указывает на более высокий уровень токсичности почвы вблизи ЖД. Данные альгологического анализа подтверждаются результатами определения содержания ТМ в почве и биопленках (табл. 29, рис. 17).

Таблица 29

Содержание валовых и подвижных форм тяжелых металлов в почве (мг/кг)

Валовые формы						
Содержание ТМ	Zn	Cd	Ni	Mn	Pb	Cu
АД	15,25±1,06	0,08±0,01	5,99±0,12	60,25±2,47	8,55±0,09	6,28±0,09
ЖД	34,85±0,49	0,177±0,005	4,48±0,11	207,50±3,53	8,76±0,13	5,45±0,03
ПДК	100,00	ОДК = 0,5	85,00	1500	30,00	55,00
Подвижные формы						
АД	3,14±0,08	0,057±0,003	0,22±0,003	8,43±0,07	2,43±0,07	0,50±0,02
ЖД	3,62±0,02	0,045±0,002	-	1,76±0,01	-	0,44±0,01
ПДК	23,00	ОДК = 0,5	4,00	80,00	6,00	3,00

Примечание: «-» - менее предела обнаружения; «АД» - автодорога; «ЖД» - железная дорога.

Флористический состав биопленок вблизи ЖД в определенной степени коррелирует с данными по количественным характеристикам этих биопленок (табл. 30, 31). Так, плотность фототрофных популяций биопленок *N. commune* у АД составляет $2,7 \cdot 10^9$ кл./г, а у ЖД – $2,0 \cdot 10^9$ кл./г.

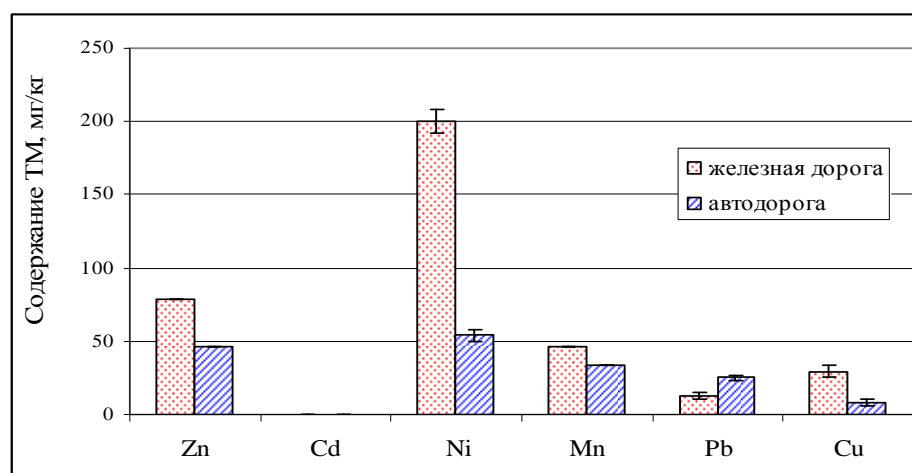


Рисунок 17. Содержание некоторых тяжелых металлов в природных пленках *Nostoc commune* различных экотопов

Цианобактериальные пленки, являясь накопителями ТМ, отражают экологическую напряженность экотопа. В пленках вблизи ЖД содержание Zn, Ni, Mg и Cu значительно превышает таковое в пленках от АД. Этот факт объясним тем, что в почвы вблизи ЖД указанные ТМ попадают при работе железнодорожного транспорта. Образцы пленок, отобранные у АД, отличаются более высоким содержанием Pb, что вполне объяснимо – многие годы использование этилированного бензина привело к его накоплению в почве.

Таблица 30

Групповой состав фототрофного комплекса *N. commune* у железной дороги

Группы фототрофов	Численность, кл./г, $\cdot 10^9$	Содержание, %
<i>Nostoc commune</i>	1,61±0,21	81,64
Другие ГЦ цианобактерии	0,05±0,01	2,53
БГЦ цианобактерии	0,21±0,019	10,85
Одноклеточные зеленые водоросли	0,10±0,015	4,98
Всего	1,972±0,135	100,00

Примечание: «ГЦ» – гетероцистные цианобактерии; «БГЦ» – безгетероцистные цианобактерии.

Благодаря своим особенностям, ЦБ обладают свойством концентрировать ТМ, тем самым, очищая почву от них (Домрачева и др., 2009). Но помимо почвы, ТМ загрязняют водные источники. Поэтому мы поставили задачу определить сорбционные возможности биопленок в водной среде.

Групповой состав фототрофного комплекса *N. commune* у автодороги

Группы фототрофов	Численность, кл./г, ·10 ⁹	Содержание, %
<i>Nostoc commune</i>	2,28±0,11	83,12
Другие ГЦ цианобактерии	0,21±0,01	7,83
БГЦ цианобактерии	0,12±0,01	4,42
Одноклеточные зеленые водоросли	0,13±0,01	4,16
Нитчатые зеленые водоросли	0,013±0,001	0,47
Всего	1,972±0,135	100,00

Примечание: «ГЦ» – гетероцистные цианобактерии; «БГЦ» – безгетероцистные цианобактерии.

4.2.3. Выявление физиолого-биохимического отклика комплекса микроорганизмов, входящих в состав биопленок *Nostoc commune*, на воздействие испытываемых поллютантов

Выявление ответных реакций организмов на условия их потенциального применения является одним из аспектов биотехнологии. Внедрение в производственную практику любой живой системы требует знаний о ее физиологических особенностях. При стрессе ЦБ возникает комплекс разнообразных изменений, которые нередко приводят к различным внутриклеточным нарушениям. В этих условиях для выживания и обеспечения жизнедеятельности крайне важным является функционирование систем поддержания гомеостаза. Поддержание клеточного гомеостаза у ЦБ при влиянии различных внешних факторов обеспечивается работой целого ряда защитных систем.

К числу важнейших относится система антиоксидантной защиты, участвующая в протекции окислительных повреждений (Ефремова, 2009; Tian, Yu, 2009). Каталазная активность показывает, насколько организм способен реагировать на образование перекиси водорода в присутствии стресс-факторов. В связи с тем, что хлорофилл и другие пигменты являются необходимой составной частью фотосинтезирующей системы, нарушение их структуры или уменьшение их количества ведет к значительному снижению фотосинтетической способности и, как следствие, – роста МО. Явление БХЛ широко используют для биотестирования токсичности ОС.

Поллютанты изменяют интенсивность люминесцентного сигнала. Ингибирование или активация БХЛ может характеризовать биологическую систему и служить для тестирования состояния среды (Кудряшева и др., 2002).

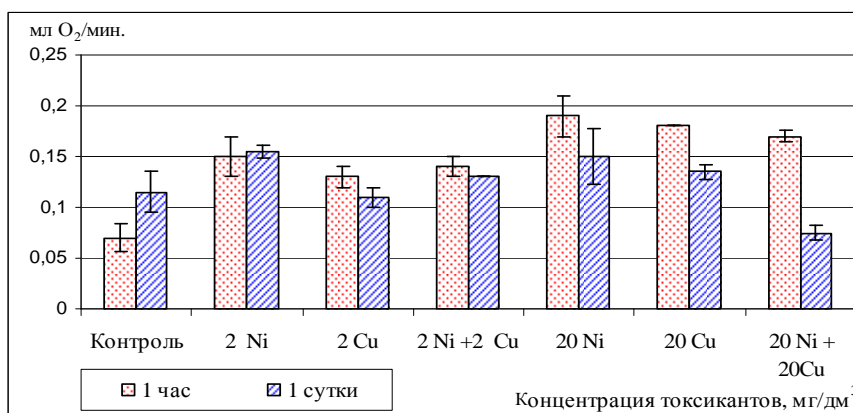


Рисунок 18. Влияние концентрации токсикантов и продолжительности экспозиции на активность каталазы биопленок *Nostoc commune* (отобраны у автодороги)

Многие ученые отмечают активную ответную реакцию ферментативных систем микробных комплексов на действие ТМ (Скворцова и др., 1980; Конышева, Коротченко, 2011; Валова и др., 2012).

Среди всех ферментов наиболее, интенсивный отклик у ЦБ выявлен для АК (Фокина, 2008). Поэтому в группу исследуемых показателей входили АК, содержание хлорофилла *a* и интенсивность БХЛ.

Выявлено, что АК при воздействии ТМ на микробные сообщества в течение 1 ч возрастает, а через 24 ч в большинстве вариантов снижается (рис. 18, 19). ТМ стимулируют АК, что говорит о возникновении критического состояния в работе биологических систем сообщества. Значения АК в контрольных вариантах обеих серий (АД и ЖД) через 1 ч близки между собой, через сутки АК пленок от АД увеличивается, а от ЖД — убывает.

Зависимость интенсивности АК МО из разных экотопов от продолжительности контакта и концентрации ТМ несколько отличается друг от друга. В серии опытов с биопленкой от ЖД значения АК почти во всех вариантах превышают 0,15 см³/мин. Через 1 сутки, если не учитывать контроль и вариант с концентрацией 2 мг/дм³, значения АК биопленок обеих

серий схожи между собой как по своим величинам, так и по закономерностям изменений.

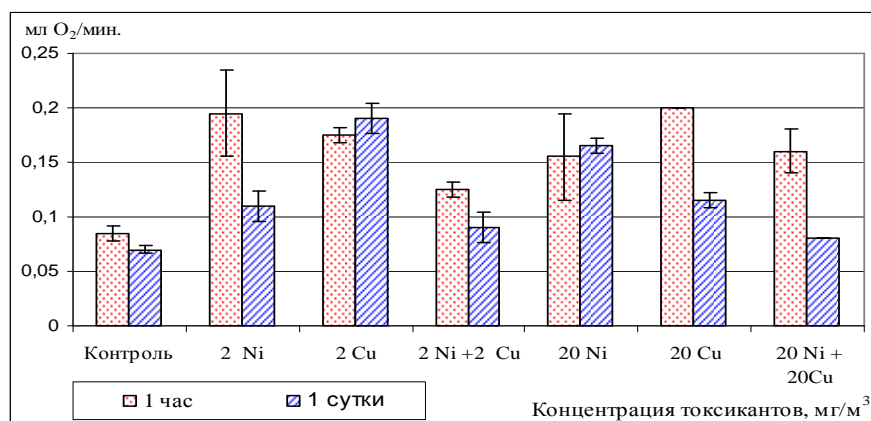


Рисунок 19. Влияние концентрации токсикантов и продолжительности экспозиции на активность каталазы биопленок *Nostoc commune* (отобраны у железной дороги)

Сила первоначального отклика на воздействие токсикантов больше в опытах с пленкой от ЖД. Можно предположить, что сообщество, отобранное вблизи ЖД, показывает большую «сопротивленческую» реакцию.

Параллельно с исследованием АК изучали влияние ионов ТМ на интенсивность БХЛ (табл. 32) и содержания хлорофилла *a* (рис. 20).

Таблица 32

Влияние ионов Ni (II) и Cu (II) и продолжительности экспозиции на интенсивность биофлуоресценции биопленок, I_{max} (мВ)

Концентрации, мг/дм ³	Вблизи автодороги		Вблизи железной дороги	
	Через 1 час	Через 1 сутки	Через 1 час	Через 1 сутки
Контроль	399 ± 25	267 ± 33	314 ± 37	209 ± 5
2 Ni ²⁺	114 ± 9	130 ± 10	347 ± 41	204 ± 22
2 Cu ²⁺	110 ± 11	3 ± 1	105 ± 6	52 ± 2
2 Ni ²⁺ + 2 Cu ²⁺	138 ± 19	2 ± 0	246 ± 29	45 ± 6
20 Ni ²⁺	222 ± 9	54 ± 10	240 ± 10	178 ± 9
20 Cu ²⁺	9 ± 2	4 ± 1	12 ± 1	0
20 Ni ²⁺ + 20 Cu ²⁺	10 ± 2	1 ± 0	11 ± 1	3 ± 0

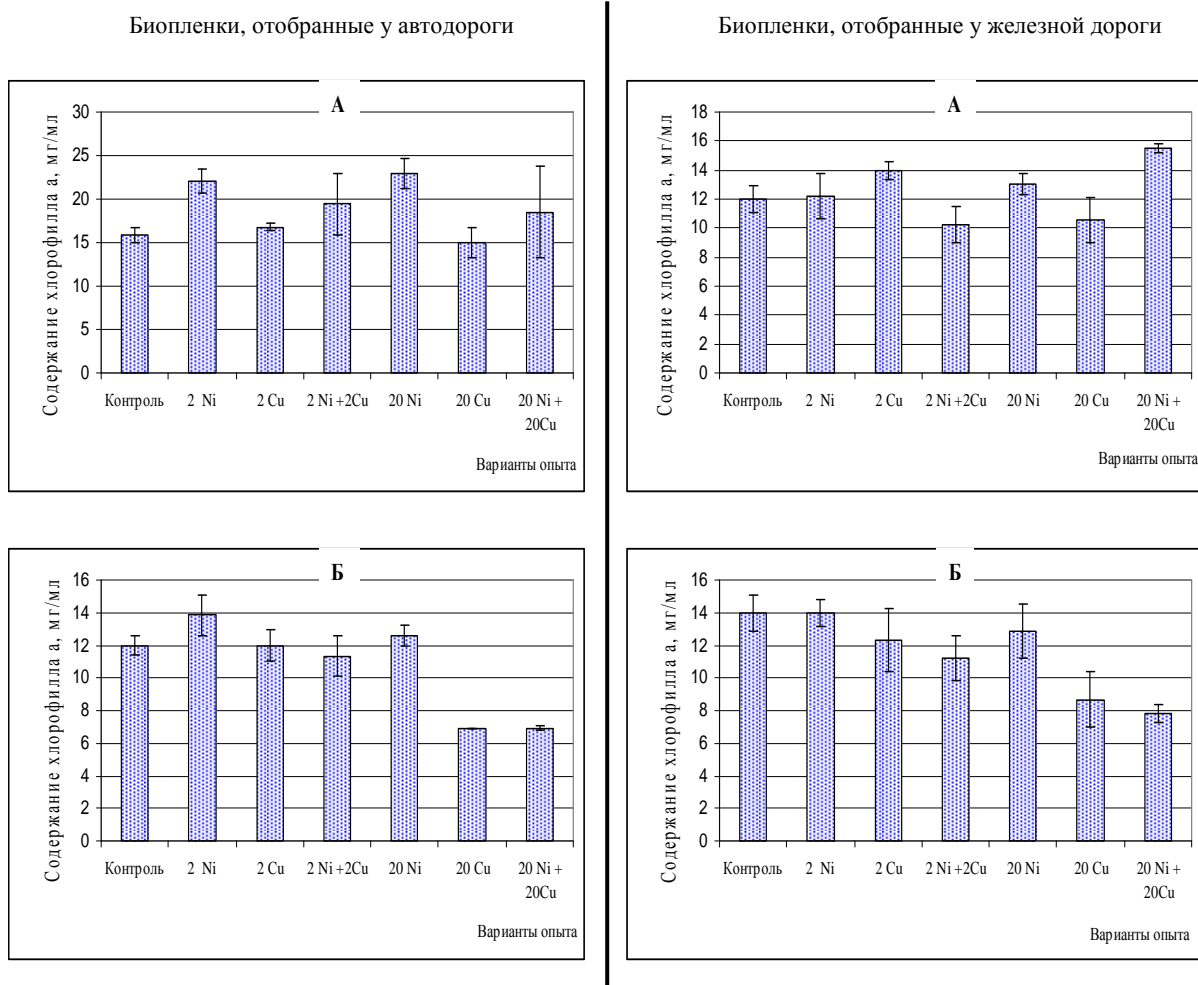


Рисунок 20. Влияние ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} и продолжительности экспозиции на содержание хлорофилла *a* в биопленках: А — через час экспозиции; Б — через сутки экспозиции

Через 24 ч почти во всех вариантах интенсивность БХЛ снижается. Особенно отчетливо это заметно в вариантах с ионами меди. В то время как влияние ионов никеля неоднозначно. По сравнению с контролем, в большинстве случаев ионы никеля ослабляют интенсивность БХЛ, но по сравнению с вариантами, где токсикантом является медь, свечение сильнее. Наиболее приемлемым при проведении биотестирования является вариант экспозиции в течение 1 суток. Показатели интенсивности БХЛ культур, отобранных у ЖД, отличаются от показателей культуры отобранных у АД. У АД варианты по увеличению токсичности среды можно расположить в следующем порядке: контроль > 2 Ni^{2+} > 20 Ni^{2+} > 20 Cu^{2+} > 2 Cu^{2+} >

$2 \text{Ni}^{2+} + 2 \text{Cu}^{2+} > 20 \text{Ni}^{2+} + 20 \text{Cu}^{2+}$. У железной дороги: контроль $> 2 \text{Ni}^{2+} > 20 \text{Ni}^{2+} > 2 \text{Cu}^{2+} > 2 \text{Ni}^{2+} + 2 \text{Cu}^{2+} > 20 \text{Ni}^{2+} + 20 \text{Cu}^{2+} > 20 \text{Cu}^{2+}$.

Результаты исследования влияния токсикантов на содержание хлорофилла *a* представлены на рисунке 20. Заметна бóльшая токсичность Cu^{2+} , чем Ni^{2+} . При этом уменьшение содержания хлорофилла наблюдается только через 24 ч. Определение феофитина, как продукта распада хлорофилла, показало, что ионы ТМ в концентрациях 2 и 20 мг/дм³ через 1 ч не вызывают образования феофитина ни в одном из вариантов (рис. 21). Через 24 ч максимальное содержание феофитина наблюдали в вариантах с высоким содержанием Cu^{2+} как в индивидуальном растворе, так и в смеси с Ni^{2+} . Кроме того, феофитин обнаружен в пленке от ЖД, где ионы ТМ находятся в смеси при концентрациях 2 мг/дм³.

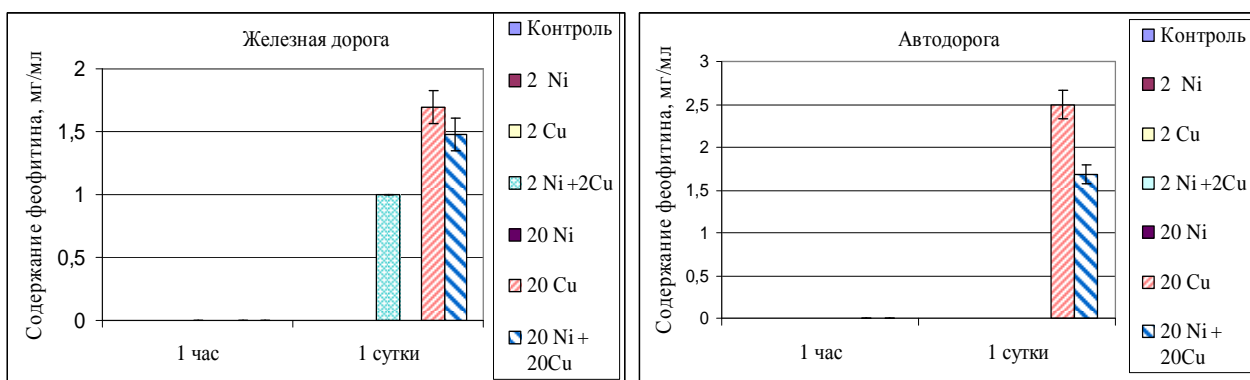


Рисунок 21. Влияние ионов никеля, меди и продолжительности экспозиции на содержание феофитина в биопленках

Сообщества биопленок *N. commune* отражают специфику техногенного воздействия на окружающую среду. Эти уникальные сообщества могут выживать и вегетировать в загрязненных местообитаниях, сохраняя видовое и родовое разнообразие и высокую плотность популяции, а также фиксировать изменения, происходящие в природе. Было выявлено, что содержание ТМ указывает на специфику антропогенного воздействия на экотоп. Так, в биопленке, отобранной у АД, наблюдается высокое содержание Рb, у ЖД – Cu, Ni, Mn, Zn. Видовое обилие фототрофов указывает на то, что токсичность местообитания вблизи ЖД выше. Доказано, что пленки, выращенные в жидкой питательной среде, обладают высокой сорбционной

способностью. При этом уровень сорбции определяется концентрацией ТМ и формой сорбента.

Так, более активное поглощение ионов Me^{2+} идет при меньшей концентрации ТМ. Отмечена повышенная поглотительная способность гомогената по сравнению с пленкой. Сорбция ТМ сообществом МО у ЖД выше, чем у АД. Добавление Me^{2+} в среду культивирования *N. commune* приводит к изменению таких физиологических и биохимических показателей биопленок, как АК, интенсивность БХЛ, содержание хлорофилла *a* и феофитина.

4.2.4. Определение сорбционной способности биопленок по отношению к ионам никеля (II) и меди (II) при различных условиях контактирования

Для данного исследования взяты плёнки *N. commune*, отобранные вблизи АД. Навески сухих биопленок 0,2 г на 1 дм³ раствора – помещали в растворы солей никеля и меди с концентрациями 2 и 20 мг/дм³, а также в смесь солей с аналогичными концентрациями каждого металла в смеси (доза-концентрация биопленок в таких условиях составляет 0,8 г/дм³).

Биопленки до выращивания считали неочищенными, а после выращивания – очищенными от ТМ, полагая, что при культивировании в биопленках происходит существенное снижение природной концентрации ТМ (табл. 33).

Таблица 33

Содержание некоторых ТМ в биопленке *Nostoc commune* до и после выращивания на среде Громова №6 без азота, мг/металла/г сухой пленки

Металл	От АД		От ЖД	
	до	после	до	после
Cu^{2+}	8,80±0,42	5,44±0,39	29,4±2,96	13,74±0,22
Pb^{2+}	22,80±0,85	13,96±1,15	14,65±1,63	7,33±1,09
Cd^{2+}	1,25±0,07	1,12±0,06	1,40±0,02	1,40±0,07
Ni^{2+}	54,04±8,45	30,08±6,02	200,00±14,80	81,28±5,09

Остаточное содержание ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} определяли в фильтрате после суточного выдерживания в растворе токсикантов (табл. 34).

Таблица 34

Остаточное содержание металлов в растворе после контакта с биопленкой *Nostoc commune* до и после очистки

Вариант	Остаточное содержание ионов металла в растворе, мг/л			
	Cu^{2+}		Ni^{2+}	
	до очистки	после очистки	до очистки	после очистки
2 Cu^{2+}	0,41 ± 0,06	0,09 ± 0,002	-	-
20 Cu^{2+}	4,10 ± 1,90	2,65 ± 0,02	-	-
2 Ni^{2+}	-	-	0,23 ± 0,01	0,03 ± 0,001
20 Ni^{2+}	-	-	10,27 ± 1,74	4,97 ± 0,001
2 Ni^{2+} + 2 Cu^{2+}	0,30 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,21 ± 0,002	0,06 ± 0,002
20 Ni^{2+} + 20 Cu^{2+}	1,53 ± 0,23	3,14 ± 0,03	12,27 ± 1,06	8,36 ± 0,03

Примечание: «-» - не определяли.

Сорбционные возможности очищенной от ТМ биопленки оказались выше. Скорее всего, при выращивании на питательной среде остались виды с большим сорбционным потенциалом и содержащиеся до очистки в биопленке ТМ препятствовали поглощению ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} .

После выявления значимости предварительной очистки МО на их сорбционные свойства провели исследование влияния формы контактирования (гомогенат и пленка) на способность сообщества очищать раствор от Me^{2+} . Продолжительность контакта этих структур с токсикантами в водной среде составила 1 сутки (табл. 35, 36).

Остаточное содержание Me^{2+} в растворе после контакта с гомогенатом меньше, чем в пленке. Очищенная пленка от ЖД сорбирует оба металла полнее почти во всех вариантах, чем пленка от АД. В вариантах со смесью ионов при концентрации 2 и 20 мг/дм³ остаточное содержание Ni^{2+} больше после контакта с гомогенатом от ЖД, чем с гомогенатом культуры от АД. Можно предположить, что повышенная сорбция пленок и гомогенатов от ЖД связана с высвобождением функциональных групп в оболочках клеток культуры при выращивании, поэтому увеличивается поглотительная емкость биопленок. Поглотительная способность гомогената выше.

Таблица 35

Остаточное содержание металлов в растворе после контакта с культурой *Nostoc commune* в виде пленки и гомогената (у автодороги)

Вариант	Остаточное содержание ионов металла в растворе, %			
	Cu ²⁺		Ni ²⁺	
	пленка	гомогенат	пленка	гомогенат
2 Cu ²⁺	20,5	4,5	-	-
20 Cu ²⁺	20,5	13,25	-	-
2 Ni ²⁺	-	-	11,5	1,5
20 Ni ²⁺	-	-	50,0	24,5
2 Ni + 2 Cu ²⁺	15,0	5,0	10,5	0,3
20 Ni + 20 Cu ²⁺	17,65	5,7	61,35	41,8

Примечание: «-» - не определяли.

Емкость поглощения зависит от многих факторов, в том числе от количества металлов в биопленке, количества Me²⁺ в растворе и формы контактирования. Так, неочищенная пленка массой 1 г сорбирует 2,2 мг Ni и 2,0 мг Cu из растворов с концентрацией металлов 2 мг/дм³ и 10,9 мг и 20,0 мг из растворов с концентрацией ТМ 20 мг/дм³ соответственно. После очистки культуры емкость поглощения увеличилась. Очищенная пленка массой 1 г сорбирует 2,3 мг Ni и 2,2 мг Cu из растворов с концентрацией ТМ 2 мг/дм³ и 13,0 мг и 20,3 мг из растворов с концентрацией 20 мг/дм³ соответственно.

Таблица 36

Остаточное содержание металлов в растворе после контакта с культурой в виде пленки и гомогената (у железной дороги)

Вариант	Остаточное содержание ионов металла в растворе, %			
	Cu ²⁺		Ni ²⁺	
	пленка	гомогенат	пленка	гомогенат
2 Cu ²⁺	4,7	2,6	-	-
20 Cu ²⁺	15,7	8,3	-	-
2 Ni ²⁺	-	-	6,5	2,0
20 Ni	-	-	32,6	30,5
2 Ni ²⁺ + 2 Cu ²⁺	4,1	2,8	8,5	4,0
20 Ni ²⁺ + 20 Cu ²⁺	21,1	15,6	48,1	42,5

Примечание: «-» - не определяли

Емкость поглощения увеличивается после гомогенизации культуры. Составляет 2,4 мг Ni и 2,4 мг Cu из растворов с концентрацией ТМ 2 мг/дм³

и 16,7 мг и 22,9 мг соответственно из растворов с концентрацией 20 мг/дм³. Для исследования Me^{2+} на некоторые биохимические процессы в клетках была проведена серия опытов, в ходе которых определяли физиолого-биохимический отклик биопленок на действие поллютантов, которая представлена в следующей главе.

4.2.5. Коэффициенты корреляции – возможные показатели загрязнения сред тяжелыми металлами

Существует несколько способов определения коэффициентов корреляции. В качестве коэффициента корреляции между переменными, принадлежащими порядковой шкале, применяется коэффициент Спирмена, а для переменных, принадлежащих к интервальной шкале, – коэффициент корреляции Пирсона. При использовании коэффициента Спирмена условно оценивают тесноту связи между признаками, считая, что с увеличением коэффициента усиливается теснота связи. Коэффициент корреляции Пирсона, характеризует степень линейной зависимости между переменными. Чем ближе его значение к «+1», тем выше линейная зависимость величин.

Результаты исследования влияния металлов на интенсивность БХЛ представлены в таблице 32. Как было сказано выше, через сутки почти во всех вариантах интенсивность БХЛ снижается. Особенно отчетливо это заметно в вариантах с ионами меди. Неоднозначно влияние ионов Ni^{2+} . По сравнению с контролем, в большинстве случаев ионы Ni ослабляют интенсивность БХЛ, но по сравнению с вариантами, где токсикантом является Cu , свечение сильнее. Наиболее приемлемым вариантом при проведении биотестирования является вариант экспозиции в течение 1 суток.

Результаты исследования влияния токсикантов на содержание хлорофилла представлены на рис. 19. Не выявлено четкой закономерности. Заметна бóльшая токсичность Cu^{2+} , чем Ni^{2+} . При этом падение содержание хлорофилла *a* наблюдается только через 1 сутки.

Рассмотрена возможность использования коэффициентов корреляции для определения зависимости между показателями, для указания степени

взаимосвязи между характеристиками объектов. Если в качестве массивов брать группы, объединенные по признаку концентрации ТМ, действию которого они подвержены, то наблюдается следующее: значения обоих коэффициентов лежат в отрицательной области, что может быть обусловлено влиянием на интенсивность БХЛ многих веществ, а не только хлорофилла.

Коэффициент Пирсона уменьшается с увеличением концентрации Me^{2+} и в смеси веществ. Для коэффициента Спирмена явной закономерности нет (рис. 22).

Судить о токсичности среды по коэффициенту Спирмена сложно, так как нами не выявлена закономерность между концентрацией токсиканта и БХЛ. Использованный коэффициент Пирсона показывает: чем выше токсичность среды, тем меньше этот коэффициент. Противоречивые результаты в контроле связаны, вероятно, с тем, что интенсивность БХЛ определяется не только количеством хлорофилла *a*. В исследованиях других ученых было показано, что в биологических системах БХЛ возникает при рекомбинации пероксидных свободных радикалов липидов, т.е. механизм БХЛ определяется реакциями окисления (Федорова, 2005).

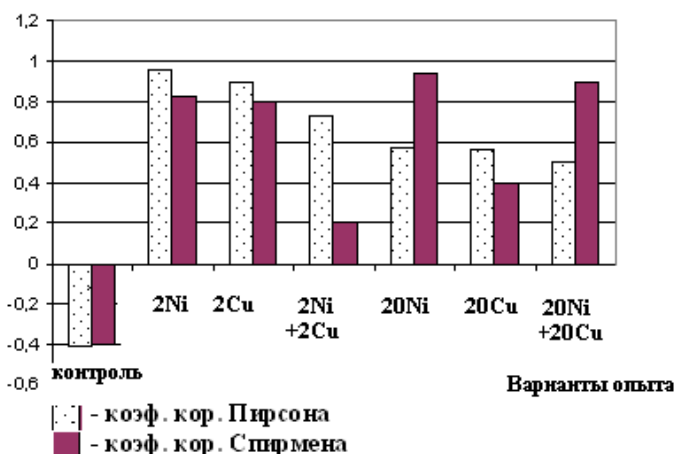


Рис. 22. Значения коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмена

Таким образом, живые системы – системы, имеющие свои законы функционирования и в этих законах не всегда однозначная зависимость. Это вносит сложности в создание системы биотестирования. Перспектив-

ным является поиск коэффициентов, способных отражать изменение связей между прямыми показателями влияния токсиканта.

4.3. Изучение физиолого-биохимического отклика и сорбционных способностей биопленок с доминированием р. *Phormidium* в условиях химического стресса

В работе использованы природные пленки ЦБ с доминированием р. *Phormidium*: Комплекс безгетероцистных ЦБ включает в себя следующие виды ЦБ: *Phormidium ambiguum*, *Phormidium boryanum*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Plectonema boryanum*. Пленки отобраны с поверхности почвы в промышленной зоне г. Кирова. На их примере также изучали физиолого-биохимический отклик ЦБ на действие ТМ и способность к сорбции.

4.3.1. Функциональные возможности почвенных цианобактерий при воздействии ионов меди (II) и никеля (II)

Одними из первых под воздействием поллютантов меняются физиолого-биохимические показатели характеристики объектов исследования. Физиолого-биохимический отклик может служить для характеристики состояния организмов и их функционального потенциала.

В данном разделе исследовано влияние на биопленки Cu^{2+} и Ni^{2+} , а также их смеси. Выбор поллютантов обусловлен тем, что поступающие на внутреннюю очистку на предприятии сточные воды содержат ионы металлов в концентрации 20 мг/дм³. Кроме того, было исследовано влияние на ЦБ ионов ТМ в концентрации, в 10 раз меньшей исходной (2 мг/дм³).

Определение показателей устойчивости ЦБ (жизнеспособность, каталазная активность, интенсивность ПОЛ, содержание хлорофилла *a* и феофитина, состояние поверхности клеток) проводили с биомассой ЦБ 0,024 г/100 см³ раствора; концентрация токсиканта по иону ТМ – 20 мг/дм³; продолжительность контакта 1 час и 24 часа.

4.3.1.1. Влияние ионов металлов на жизнеспособность клеток цианобактерий в биоклетках с доминированием цианобактерий р. *Phormidium*

Опыт по исследованию жизнеспособности клеток ЦБ тетразольно-топографическим методом проводили после суточной экспозиции с биомассой ЦБ р. *Phormidium*, равной 0,0241 г/100 см³ раствора, по методике, описанной в Главе II. ТМ были представлены в концентрации 20 мг/дм³.

Таблица 37

Влияние ионов меди (II) никеля (II) на дегидрогеназную активность цианобактерий, %

Вариант	Контроль		Ni ²⁺		Cu ²⁺	
	Клетки, %		Клетки, %		Клетки, %	
	Живые	Мертвые	Живые	Мертвые	Живые	Мертвые
Пленка	82,08±,58	17,98±4,58	52,78±,01	47,22±,01	0,23 ± 0,06	99,77±,06
Гомогенат	97,14±,82	2,86 ± 0,82	29,53±,63	70,47±,63	0	100

Установлено, что при действии ТМ резко уменьшается количество живых клеток (табл. 37). Сильным токсическим эффектом обладает Cu. Так, число живых клеток после ее воздействия мало и составляет 0,23±0,06 % в пленке, а в гомогенате жизнеспособные клетки ЦБ совсем отсутствуют.

В целом, как ионы Cu²⁺, так и ионы Ni²⁺ оказывают более сильный токсический эффект на культуру в гомогенизированном состоянии, нежели в пленке. Это можно объяснить тем, что в гомогенате доля клеток, подверженных воздействию ТМ больше, чем в пленке.

4.3.1.2. Влияние ионов металлов на каталазную активность

Каталаза – это фермент из группы оксидоредуктаз. Функция фермента сводится к разрушению токсической перекиси водорода, образующейся в ходе различных окислительных процессов в организме.

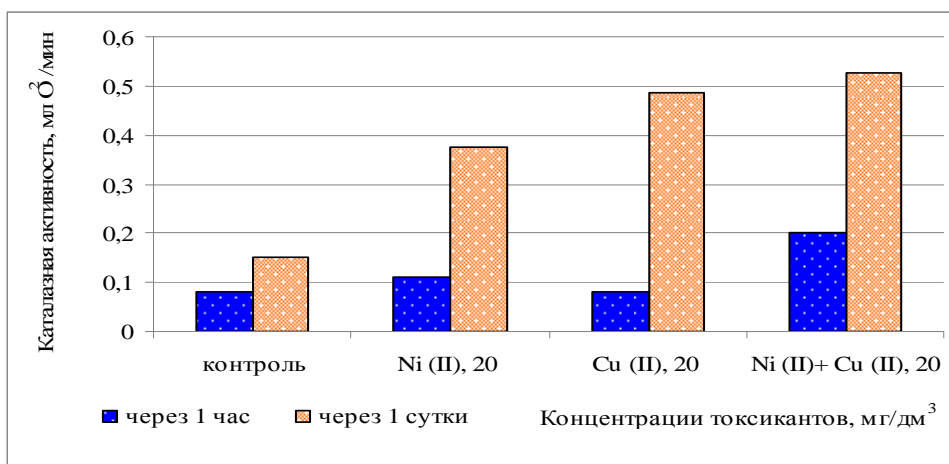


Рисунок 23. Влияние ионов ТМ на каталазную активность пленок с доминированием цианобактерий р. *Phormidium*

Результаты измерения АК представлены на рисунке 23. Выявлено, что через 1 сутки АК усиливается во всех изученных вариантах. Увеличение АК в контроле можно объяснить тем, что за 24 ч культура растет, увеличивается размер популяции и, как следствие, усиливается ферментативная активность. При этом АК через 1 сутки в 3 и более раз выше, чем при часовом воздействии ТМ. Вероятно, это связано со стимулирующим влиянием стрессовых факторов на организмы, в частности, с усилением работы дыхательной системы, что является своеобразной защитной реакцией организмов на воздействие стрессовых факторов, механизмом их адаптации к стрессу.

Также следует отметить, что больший токсический эффект на культуру оказывает смесь ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} . Уже при часовом воздействии смеси ионов ТМ АК в 2,5 раза выше, чем при воздействии ионов Cu^{2+} индивидуально. Низкую АК при часовом воздействии ионов Cu^{2+} в концентрации 20 мг/дм³ можно объяснить с двух позиций: во-первых, Cu^{2+} вызывают гибель клеток, во-вторых, Cu входит в состав многих ферментов, поэтому Cu^{2+} не оказывают столь сильный токсический эффект при 1 часовом воздействии.

4.3.1.3. Влияние ионов меди и никеля на интенсивность перекисного окисления липидов

Известно, что активация процесса ПОЛ мембран, протекающего в норме на определенном стационарном уровне и необходимого в целом для жизнедеятельности, является одной из наиболее ранних реакций на действие стрессора.

Активация каталазы через час после действия смеси Ni+Cu (см. 4.3.1.2) сопровождалась накоплением в культуре ЦБ продукта ПОЛ – малонового диальдегида, что свидетельствует об окислительном повреждении мембран.

Таким образом, видно, что в случае с ионами меди происходит увеличение интенсивности ПОЛ (табл. 38). Однако ионы ТМ, их концентрации и время воздействия на ЦБ действуют по-разному. Так, при продолжительности контакта 1 час действие катионов меди (II) в концентрации 20 мг/дм³ вызывает сравнительно небольшое усиление ПОЛ (около 5,5%), тогда как одновременное присутствие солей меди и никеля в тех же концентрациях увеличивает скорость процесса окисления примерно в 2,5 раза. Такой эффект может быть обусловлен, как минимум, двумя причинами: повышением общей концентрации поллютанта и/или их синергетическим действием. Это свидетельствует о том, что поллютанты инициируют процессы, вызывающие повреждение клеточных мембран и нарушение функционирования клеток.

Таблица 38

Влияние поллютантов на накопление малонового диальдегида в пленках цианобактерий рода *Phormidium* при разной длительности воздействия

Время действия ТМ, час	Контроль	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Ni+Cu ²⁺
Содержание МДА, нмоль/мл				
1	0,18±0,01	0,08±0,01	0,19±0,01	0,44±0,03
24	0,12±0,01	0,02±0,01	0,11±0,01	0,14±0,02

Однако через 24 часа контакта интенсивность ПОЛ во всех рассмотренных вариантах снижается. Это можно объяснить с двух позиций. Во-

первых, культура адаптируется к изменившимся условиям (что подтверждают данные об усилении каталазной активности). Во-вторых, клетки ЦБ под действием ТМ гибнут, и, следовательно, прекращаются биохимические процессы окисления.

В вариантах с ионами Ni^{2+} через 1 час после воздействия ТМ ПОЛ усиливается, затем через 1 сутки снижается. Это говорит о том, что поллютанты инициируют процессы, вызывающие повреждение клеточных мембран и нарушение функционирования клеток. Через сутки происходит восстановление содержания продуктов ПОЛ.

4.3.1.4. Влияние ионов меди и никеля на содержание хлорофилла *a* и феофитина

ЦБ обладают полноценным фотосинтетическим аппаратом, характерным для окисленных фотосинтетиков. Поэтому об устойчивости ЦБ можно судить и по соотношению хлорофилла *a* и феофитина в клетках. В контрольных опытах (без ТМ) в формициевой биопленке достаточно высокое (примерно одинаковое через 1 и 24 часа) содержание хлорофилла *a* и практически отсутствует феофитин, т.е. фотосинтетическая способность ЦБ не нарушена (рис. 24, рис. 25).

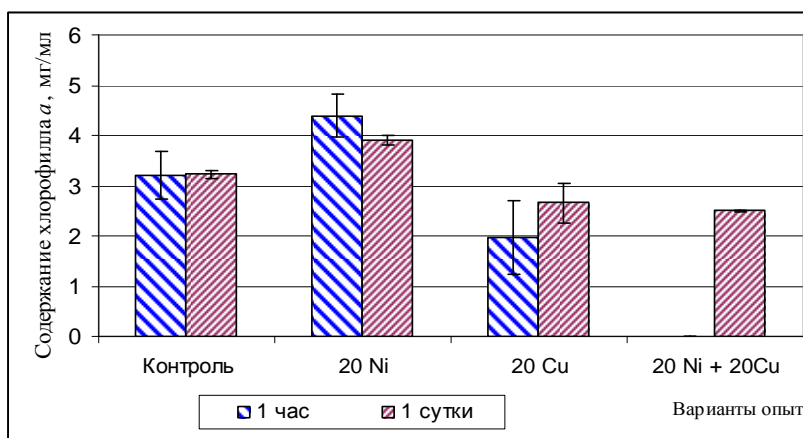


Рисунок 24. Влияние поллютантов на содержание хлорофилла *a* в пленках р. *Phormidium* при воздействии токсикантов в течение 1 ч и 1 суток

Кратковременное действие ТМ приводило к значительному снижению содержания хлорофилла *a* в вариантах с ионами Cu и смесью ионов

Cu^{2+} и Ni^{2+} (рис. 24). Снижение уровня хлорофилла в биопленке ЦБ сопровождается возрастанием количества феофитина (рис. 25).

Накопление феофитина в культуре ЦБ свидетельствует о разрушении хлорофилла *a* под влиянием Me^{2+} . Через 1 сутки отмечается уменьшение количества феофитина и увеличение содержания хлорофилла (рис. 24, 25).

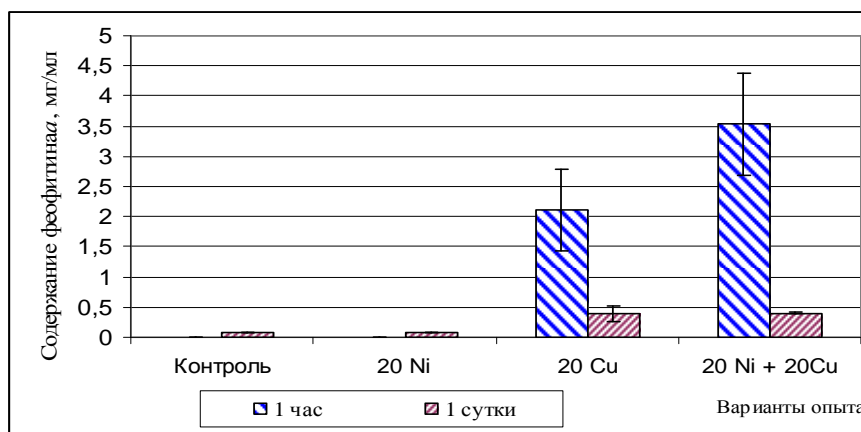


Рисунок 25. Влияние поллютантов на содержание феофитина в пленке с доминированием р. *Phormidium* в течение 1 и 24 ч

Увеличение содержания хлорофилла *a* и снижение интенсивности процессов ПОЛ в культуре ЦБ через сутки действия поллютантов свидетельствует об адаптации ЦБ к стрессовым условиям.

4.3.1.5. Влияние ионов меди никеля на интенсивность биохемилюминесценции почвенных цианобактерий

При действии ионов Cu и Ni наблюдается разная реакция на действие испытуемых поллютантов. В контрольных вариантах с уменьшением титра уменьшается максимальная интенсивность быстрой вспышки (рис. 26). В вариантах с поллютантами в обоих случаях наблюдается уменьшение свечения по мере разбавления культуры ЦБ. Особенно сильное воздействие оказывают на культуру ионы Cu^{2+} . Например, при разбавлении 1:4 свечение по сравнению с контролем уменьшается в 21 раз. Противоположное действие оказывают ионы Ni^{2+} , которые, напротив, увеличивают свечение биопленок с доминированием р. *Phormidium* по сравнению с контролем, т. е. можно предполагать об эффекте стимулирования. Особенно это

заметно в вариантах с разбавлением исходной суспензии в 8 и 16 раз (табл. 39).

Активация БХЛ катионами может быть объяснена влиянием катионов на стадии образования и эволюции электронно-возбужденных состояний. При этом может образовываться более эффективный дополнительный канал для переноса энергии электронного возбуждения через электронно-возбужденные состояния молекул-акцепторов. Кроме того, налицо известный эффект – увеличение скорости ферментативных реакций в результате активации ферментативных групп катионами переходных металлов. Ингибирование биолюминесценции катионами металлов может быть результатом необратимого присоединения электрона. Такие взаимодействия характерны как раз для ионов меди. Таким образом, воздействие солей металлов на ферментативную биолюминесцентную систему показывает, что ингибирование и активация биолюминесценции – результат воздействия катионов на процессы миграции электронной плотности. Поскольку миграция электронной плотности является основой всех элементарных физических и химических процессов, следовательно, физико-химические характеристики способности акцептирования электронной плотности ксенобиотиками, а именно, сродство к электрону, редокс-потенциал, интегрируют все эффекты ксенобиотиков на сложные биологические системы (Кудряшева и др., 2002).

Таблица 39

Влияние разбавления и ионов тяжелых металлов на интенсивность биохемилюминесценции биопленок с доминированием р. *Phormidium*

Разбавление культуры ЦБ	Интенсивность биохемилюминесценции, J мВ		
	Контроль	Ni ²⁺	Cu ²⁺
1	2646±40	2657±43	649±9
1:2	2408±88	2498±44	115±14
1:4	1845±84	1887±63	163±1
1:8	986±29	1753±79	90±9
1:16	451±25	862±52	47±1

Результаты определения хлорофилла *a* в биопленке представлены на рисунке 25. Видна зависимость концентрации хлорофилла от титра клеток: с уменьшением титра уменьшается и количество хлорофилла на объем суспензии. Сходные значения наблюдаем в контрольном варианте и в варианте с Ni^{2+} . Похожая зависимость была отмечена выше при сравнении результатов по интенсивности свечения ЦБ. Данный факт подтверждает тесную взаимосвязь между биохемилюминесценцией и количеством хлорофилла *a* в биопленках ЦБ. В контрольном варианте между люминесценцией и содержанием хлорофилла *a* $r_{\text{п}}=0,92$, в вариантах с воздействием ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} $r_{\text{п}}=0,81$ и $0,70$ соответственно. Этот факт, несомненно, говорит о функциональной связи исследуемых параметров. Ионы меди оказывают более токсичное действие. В вариантах с их воздействием коэффициент корреляции между содержанием хлорофилла *a* в культуре и интенсивностью БХЛ меньше, чем в контроле и в вариантах с ионами никеля. В присутствии токсикантов корреляция между показателями становится ниже, чем в контрольных вариантах.

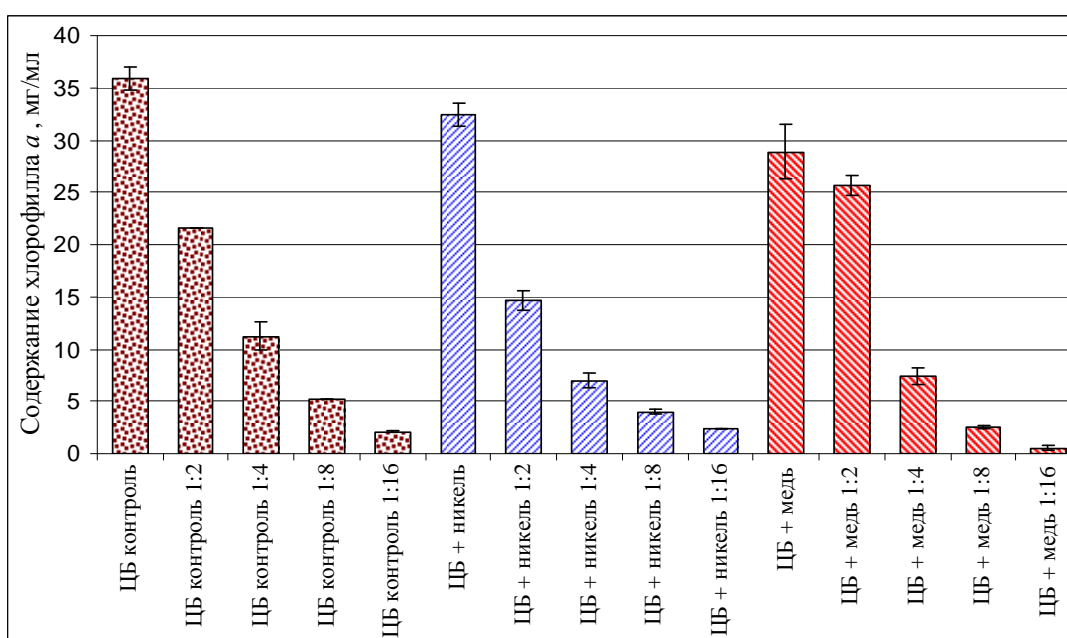


Рисунок 26. Влияние разбавления и ионов тяжелых металлов на содержание хлорофилла *a* в биопленке с доминированием *r. Phormidium*

Таким образом, в данном разделе представлены результаты, свидетельствующие о зависимости интенсивности БХЛ от количества хлорофилла

а в биопленках почвенных ЦБ с доминированием ЦБ р. *Phormidium* с разным титром в условиях загрязнения Cu и Ni. Показана корреляция между данными показателями, которая говорит об их взаимосвязи.

4.3.2. Сорбционные возможности почвенных биопленок с доминированием цианобактерий р. *Phormidium* при воздействии ионов никеля (II) и меди (II)

Ранее была доказана способность природных биопленок с доминированием *N. commune* к извлечению ТМ из окружающей среды в природных условиях. Помимо биопленок с доминированием азотфиксирующих форм ЦБ, широко распространено явление «цветения» химически загрязненных почв, при котором доминирующую роль играют безгетероцистные ЦБ, среди которых эдификатором наземных фототрофных комплексов очень часто является ЦБ р. *Phormidium* (Домрачева, 2005; Домрачева и др., 2006).

4.3.2.1. Сорбционная способность почвенных цианобактерий в гомогенизированном и пленочном состоянии при воздействии тяжелых металлов

Помещенные в жидкую питательную среду различные штаммы ЦБ по мере роста приобретают текстуру, напоминающую псевдоткань, состоящую из переплетенных трихомов и нитей. В подобной пленке доступ ТМ к отдельным клеткам затруднен и, вероятно, пленки должны быть более стойкими к действию токсикантов. Поэтому сравнить способность биопленок и гомогената к сорбции ТМ. Опыт проводили с биомассой многовидовой биопленки с доминированием ЦБ р. *Phormidium*, 0,024 мг/100 см³ раствора; концентрация токсикантов по иону ТМ составляла 20 мг/дм³; продолжительность экспозиции 1 сутки. Результаты опыта представлены в таблице 40.

Влияние гомогенизации на остаточное содержание ионов ТМ в растворе

Варианты	Остаточное содержание металлов, мг/дм ³	Снижение концентрации металлов в растворе, %
Ni ²⁺ (пленка)	13,19±0,01	≈ 34
Ni ²⁺ (гомогенат)	11,07±0,02	≈ 45
Cu ²⁺ (пленка)	1,96±0,01	≈ 90
Cu ²⁺ (гомогенат)	1,63±0,01	≈ 92

Опыт показал, что цианобактериальный комплекс снижает концентрацию токсиканта на 90-92% в случае с Cu²⁺ и до 34-45% при действии Ni²⁺. При этом большей способностью к уменьшению концентрации Me²⁺ в растворе обладают ЦБ в виде гомогената, что обусловлено увеличением поверхности раздела фаз при гомогенизации и повышением сорбционной емкости.

4.3.2.2. Влияние массы цианобактерий на остаточное содержание ионов меди (II) и никеля (II) в растворе

Цель данного опыта – изучение зависимости остаточной концентрации ТМ от биомассы ЦБ, а также выявление той биомассы ЦБ, при которой остаточное содержание ионов Cu и Ni достигает значений, меньших ПДК (0,1 мг/дм³ для воды водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования). В опыте использованы биопленки с биомассой 0,002; 0,003; 0,006; 0,031 г/см³.

Влияние биомассы цианобактерий на остаточное содержание Cu²⁺ и Ni²⁺ в растворе

Биомасса ЦБ, г/100 см ³	Титр (·10 ⁹), кл./см ³	Остаточное содержание ТМ в растворе, мг/дм ³	
		Ni ²⁺	Cu ²⁺
0,002	2,15	13,96±0,09	4,52±0,02
0,003	4,3	11,32±0,28	3,79±0,05
0,006	8,6±1,35	0,97±0,06	0,47±0,07
0,031	10,9±1,56	0,04±0,01	0,10±0,02

Примечание: жирным шрифтом отмечено снижение содержания ионами металлов до уровня ПДК.

При концентрации ТМ 20 мг/дм³ и продолжительности экспозиции 1 сутки остаточное содержание ионов ТМ в растворе значительно умень-

шается. Показано, что чем больше биомасса, тем меньше остаточное содержание ТМ (табл. 41). При малых значениях биомассы ЦБ (<0,006 г/100 см³) сорбционной емкости для детоксикации не хватает. При биомассе 0,006 г/см³ происходит резкое снижение остаточной концентрации ионов металлов в растворе. Эффективным является содержание биомассы ЦБ около 0,03 г/100 см³ раствора: именно в этом случае происходит снижение содержания ионов Me²⁺ до уровня ПДК и ниже.

4.3.2.3. Влияние продолжительности контакта на остаточное содержание металлов в растворе

Известно, что связывание Me²⁺ клеточной поверхностью максимально происходит в первые минуты контакта. Затем следуют медленные процессы переноса металла в цитоплазму клетки. Этот энергозатратный процесс. Поэтому возникла необходимость проанализировать влияние продолжительности контакта на остаточное содержание металла в растворе.

Для этого довели титр исследуемой биопленки с доминированием р. *Phormidium* до величин $(1,10 \pm 0,15) \cdot 10^{10}$ кл./см³, что составляет 0,031 г /100 см³, в растворах сульфата Ni и Cu с концентрацией ионов ТМ 20 мг/дм³. Варьировали продолжительность контакта ЦБ с растворами ТМ.

Действие ионов меди (II). Выявлено, что уже через 1 час после контакта ЦБ с ионами ТМ (начальная концентрация 20 мг/дм³) содержание последних в растворе резко уменьшается: на 99 % в случае индивидуальной соли и на 96 % в смеси солей (табл. 42).

Таблица 42

Остаточное содержание токсиканта после контакта с пленкой с доминированием р. *Phormidium*, мг/дм³

Вариант	Продолжительность контакта		
	1 час	24 часа	14 суток
Cu ²⁺	0,10±0,02	0,18±0,03	0,90±0,06
Cu ²⁺ в смеси	0,25±0,07	0,29±0,02	1,33±0,03

Однако более продолжительный контакт культуры с токсикантом замедляет скорость снижения концентрации Cu²⁺ в растворе (происходит да-

же некоторое ее увеличение) (рис. 27). Это становится заметным уже через 24 часа контакта, а через 14 суток повышение концентрации Cu^{2+} в растворе становится очевидным.

Данный факт можно объяснить с двух позиций. Во-первых, культура адаптируется и выбрасывает часть ионов, поступивших первоначально, из клетки в окружающую среду. В этом проявляется адаптация организмов к условиям обитания. Во-вторых, повышение содержания ТМ в растворе может быть вызвано разрушением клеточных стенок МО и, соответственно, пассивным выходом ионов в раствор.

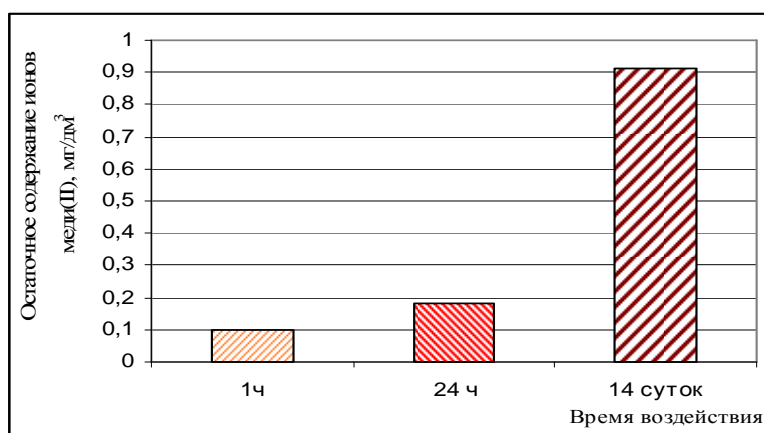


Рисунок 27. Остаточное содержание ионов меди (II) в зависимости от времени контакта

Возможно одновременное влияние обоих факторов, хотя уменьшение феофитина в клетках, ослабление ПОЛ, усиленная каталазная активность и увеличение содержания хлорофилла *a* через сутки указывают все-таки, прежде всего, на адаптацию организмов.

Таким образом, выявлена высокая способность гомогената цианобактериальных пленок с доминированием р. *Phormidium* снижать концентрации ионов Cu^{2+} при часовом воздействии до уровня ПДК. При этом из индивидуальных растворов с максимальной концентрацией $20 \text{ мг } \text{Cu}^{2+}/\text{дм}^3$ степень очистки составляет 99%. Из растворов, содержащих Cu^{2+} с Ni^{2+} , концентрация Cu^{2+} снижается на 96%.

Действие ионов никеля (II). В фильтрате определяли остаточное содержание Ni^{2+} сразу после внесения биопленок в токсикант, а также через

1, 3, 24 часа (табл. 43). Как следует из результатов, приведенных в таблице 43, Ni^{2+} из смеси извлекается в меньшей степени, чем индивидуально. Данная зависимость может быть обусловлена тем, что Cu^{2+} токсичнее Ni^{2+} и извлекается в первую очередь. Оптимальное время контактирования – 1 час. Уже через сутки происходят процессы десорбции ионов ТМ в культуральную жидкость, которые возможно связаны с адаптацией.

Таблица 43

Влияние продолжительности контактирования на эффективность сорбции биопленки с доминированием р. *Phormidium*

Продолжительность контактирования, час	Остаточное содержание ионов никеля (II), мг/дм ³	
	Ni^{2+}	Ni^{2+} в смеси с Cu^{2+}
0	0,31±0,05	0,67±0,04
1	0,13±0,05	0,25±0,07
3	0,04±0,02	4,2±0,8
24	0,29±0,02	0,84±0,03

Через 14 суток происходит увеличение остаточной концентрации Ni^{2+} (табл. 44). Это может быть следствием адаптации, механизм которой заключается в связывании ионов ТМ с серосодержащими соединениями и выходом ТМ в культуральную жидкость вместе с сульфатным остатком.

Таблица 44

Остаточное содержание ионов никеля в растворе под биопленками с доминированием р. *Phormidium*, мг/дм³

Вариант	Продолжительность контактирования, сутки	
	1	14
2 Ni	0,12±0,03	1,32±0,33
20 Ni	0,14±0,04	3,06±0,77
2 Ni (из смеси)	0,20±0,05	0,73±0,18
20 Ni (из смеси)	0,61±0,15	3,69±0,92

При проведении очистки воды от ионов ТМ нет необходимости в постоянном встряхивании, достаточно перемешать культуру ЦБ в растворе, содержащем ТМ, 1-2 раза в течение времени контакта (1 час). Пленки могут широко применяться в очистке природных сред от Cu^{2+} . Большинство способов не подходит для этих целей из-за своей потенциальной токсичности. Данный объект, являясь природным напочвенным разрастанием фото-

трофов, не содержит патогенов и токсиногенов. С помощью биосорбента представляется возможность очистки прудов, рек и других водных объектов в городской черте, предотвращение аккумуляции в среде токсикантов.

4.3.2.4. Влияние ионов меди (II) и никеля (II) на качественный состав органических веществ в культуральной жидкости биопленок с доминированием р. *Phormidium*

Сорбционная способность цианобактериальных пленок обусловлена интенсивным выделением внеклеточной слизи, состоящей из полисахаридов и липофильной фракции клеток. Кроме того, возможна дистанционная детоксикация, при которой связывание Me^{2+} происходит экзополисахаридами в культуральной среде. Поэтому возникла необходимость анализа состава органических соединений в культуральной жидкости.

При исследовании культуральной жидкости контрольного варианта было обнаружено более 35 различных соединений обширного спектра классов органических соединений. Большинство из них имеют высокую молекулярную массу, более 150 а.е.: 32% по массовому содержанию приходится на гексадекановую кислоту, 25% на холеста-4,6-диен-3-ол, 13% на октадекановую кислоту.

Известно, что в процессе детоксикации ТМ у клеток ЦБ большую роль играют соединения серы и азота. Поэтому в дальнейшем мы исследовали влияние Cu^{2+} и Ni^{2+} на массовую долю азотсодержащих и серосодержащих соединений в массе всех органических веществ жидкости.

Через 1 сутки экспозиции культуры ЦБ с растворами ТМ происходит резкое увеличение доли азот- и серосодержащих соединений (табл. 45). В ряду вариантов с ТМ наблюдается закономерность: чем выше концентрация Cu^{2+} , тем меньше доля серосодержащих веществ. К 14-м суткам вклад серосодержащих соединений значительно уменьшается, а в большинстве вариантов сводится к нулю. Доля азотсодержащих соединений уменьшается незначительно, а в вариантах Cu^{2+} , 20 мг/дм³ и $Ni^{2+} + Cu^{2+}$, 20 мг/дм³ су-

щественно возрастает. Стимулирование образования азотсодержащих соединений, а также увеличение количества клеток, отвечающих за азотфиксацию в присутствии токсикантов, было отмечено и другими авторами (Узварова и др., 2005; Кадырова и др., 2007). Могут быть два основных объяснения происходящим явлениям. Присутствие тяжелых металлов вызывает процессы, способствующие биоразложению соединений, не содержащих серу и азот или преобразование их в соединения, содержащие указанные элементы, а также экскрецию из клетки веществ, способствующих детоксикации (Гапочка, 1981). Это предположение подтверждают данные таблицы 46.

Таблица 45

Влияние Cu^{2+} и Ni^{2+} на массовую долю азотсодержащих и серосодержащих соединений в общей массе всех органических веществ фильтрата

Вариант *	Группа соединений	Массовая доля, %	
		1 сутки	14 суток
Контроль (вода)	азотсодержащие	14,8	-
	серосодержащие	6,7	8,0
2 Ni^{2+}	азотсодержащие	42,0	30,2
	серосодержащие	33,0	-
2 Cu^{2+}	азотсодержащие	52,5	50,2
	серосодержащие	20,1	-
2 Ni^{2+} + 2 Cu^{2+}	азотсодержащие	50,3	40,4
	серосодержащие	18,8	2,0
20 Ni^{2+}	азотсодержащие	13,3	-
	серосодержащие	13,3	-
20 Cu^{2+}	азотсодержащие	48,8	100
	серосодержащие	13,9	-
20 Ni^{2+} + 20 Cu^{2+}	азотсодержащие	22,2	74,5
	серосодержащие	-	-

Примечание: «*» – по содержанию токсиканта, мг/дм³; «-» – не обнаружено.

Преобразование в соединения, содержащие S и N, интенсифицирует процесс утилизации ТМ. Уменьшение серосодержащих соединений на 14-е сутки возможно связано с биоразложением углеводородного радикала и высвобождением соединения металла с кислотным остатком, содержащим S. Анализ показал, что под действием ТМ разнообразие соединений резко уменьшается (табл. 46). Через 1 сутки резко уменьшается количество углеводородов в вариантах, содержащих ионы меди, а аминов возрастает. Поч-

ти во всех вариантах с ТМ увеличивается доля кетонов и уменьшается доля эфиров. В большинстве вариантов появляются фосфор- и серосодержащие соединения. Через две недели экспозиции с токсикантами в культуральной жидкости всех вариантов, подвергшихся воздействию ТМ, не удалось обнаружить углеводороды, кислоты и ангидриды, фосфорсодержащие соединения. Однако, увеличивается содержание кетонов и эфиров по сравнению с контролем. Разнообразие соединений в фильтрате снижается в ряду: контрольный вариант → 24-х часовая экспозиция → 2-х недельная экспозиция.

Таблица 46

Влияние меди и никеля на долю определенного типа функциональных групп в сумму функциональных групп смеси органических веществ, %

Основные классы функциональных групп		Вариант (по содержанию токсиканта, мг/дм ³)						
		Контроль	2 Ni	2 Cu	2 Ni + 2 Cu	20 Ni	20 Cu	20 Ni + 20 Cu
Углеводороды	А	14,0	18,0	-	3,2	14,3	1,8	-
	Б	39,1	-	-	-	-	-	-
Спирты	А	7,3	12,6	10,4	6,2	23,8	10,8	16,7
	Б	12,3	12,5	11,0	18,0	-	-	23,8
Кетоны	А	7,3	27	16,9	12,8	4,7	24,3	16,7
	Б	-	-	33,0	18,0	50,0	20	48,0
Ангидриды и кислоты	А	7,3	1,8	1,6	3,2	10,5	1,8	8,3
	Б	16,4	-	-	-	-	-	-
Эфиры	А	48,8	23,4	14,3	19,2	23,5	6,3	37,5
	Б	20,5	62,5	11,0	36,0	50,0	60,0	-
Амины	А	14,6	12,6	40,5	33,2	9,5	39,6	20,8
	Б	-	25	44	10,2	-	20,0	28,6
Серосодержащие	А	0,4	-	13,3	16,0	14,3	8,1	-
	Б	8,6	-	-	18,0	-	-	-
Фосфорсодержащие	А	-	2,6	3,2	-	1,8	-	-
	Б	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – не обнаружено; А – через 1 сутки, Б – через 14 суток.

Таким образом, в ходе исследования выявлено, что ТМ существенно влияют на специфику органических соединений в культуральной жидкости, следовательно, и на биохимические процессы в клетках. Возрастание доли серос- и азотсодержащих соединений в первые сутки экспозиции с ТМ может служить индикационным признаком на присутствие ионов ТМ.

В дальнейшем, для создания полной картины происходящих процессов необходимо выявить связь между спецификой соединений и количеством ионов ТМ в растворе; такими физиолого-биохимическими показателями, как АК, содержание хлорофилла *a* в клетках, ПОЛ и т. д.

4.3.3. Влияние ионов меди (II) и никеля (II) на структуру поверхности клеток цианобактерии

Исследование изменений структурных особенностей ЦБ методом РЭМ (методика выполнения анализа описана в Главе II) показало, что при любой продолжительности контакта с ТМ структура слизистого чехла пленки меняется (рис. 28 – 31). При любых условиях прослеживается сходная картина: наблюдается разрыв связей между компонентами пленки (рис. 28).

В контрольном варианте (рис. 28, а) ЦБ облеплены бактериями-спутниками. Под действием токсикантов бактерии-спутники выстраиваются в отдельные самостоятельные колонии (рис. 28, б – г). При контакте клеток ЦБ с ионами Ni^{2+} в концентрации 2 мг/дм³ (рис. 30) происходит частичное разрушение слизистых чехлов ЦБ, что приводит к выходу части клеток бактерий-спутников на внешнюю поверхность объекта.

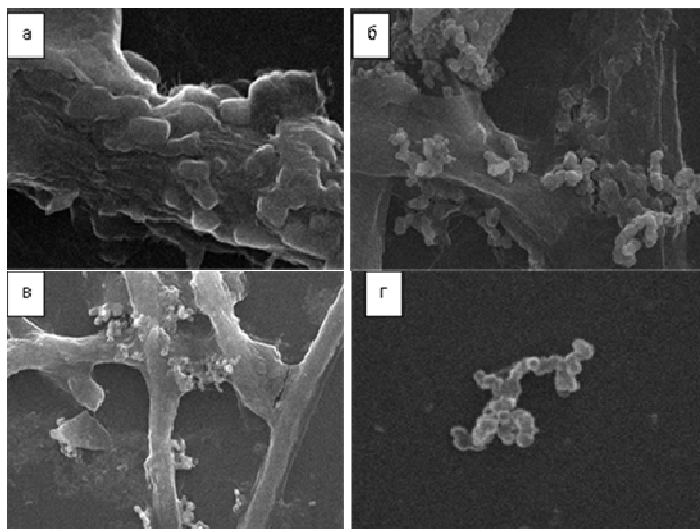


Рисунок 28. Изменение структуры биопленок с доминированием р. *Phormidium* под действием токсикантов: а – контрольный вариант; б – под действием смеси ионов; в, г – под действием ионов меди

При контакте клеток ЦБ с Ni в концентрации 20 мг/дм³ (рис. 31) происходит практически полное разрушение слизистых чехлов ЦБ, что приводит к выходу части клеток бактерий-спутников на внешнюю поверхность объекта, а другой части – в культуральную жидкость.

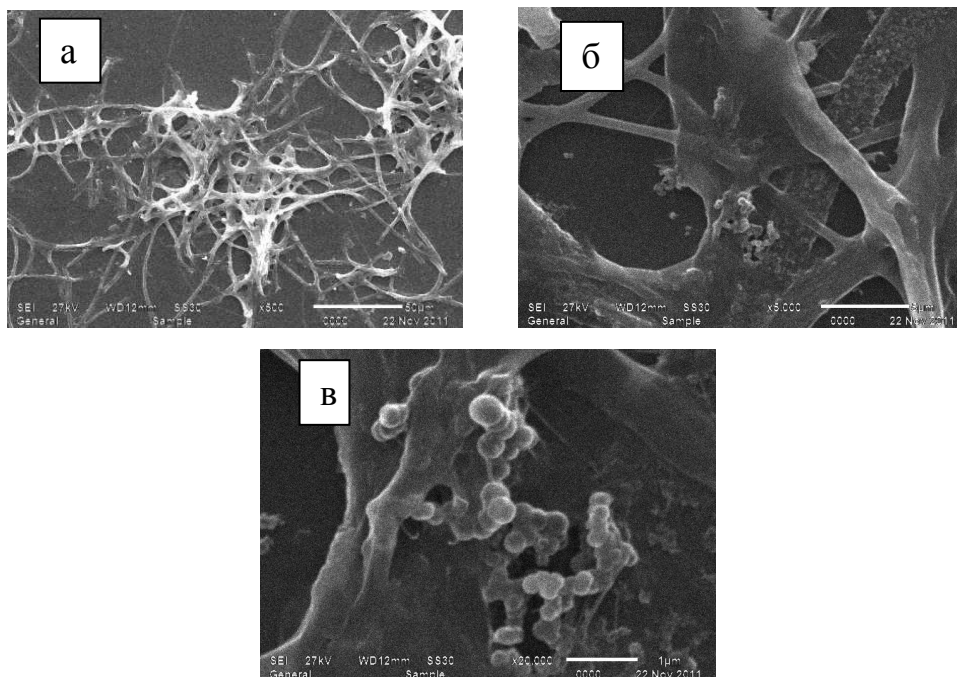


Рисунок 29. Вид поверхности клеток цианобактерий р. *Phormidium* без воздействия токсикантов при увеличении в: а – 500 раз, б – 5000 раз, в – 10000 раз

Подобная картина наблюдается и в присутствии ионов Cu^{2+} . В целом, ионы ТМ, вступая во взаимодействие с компонентами слизистых чехлов ЦБ, нарушают физико-химические свойства чехла, делая его непригодным для существования в нем спутников. Происходит изменение цвета пленок – с токсикантами они становятся более темными.

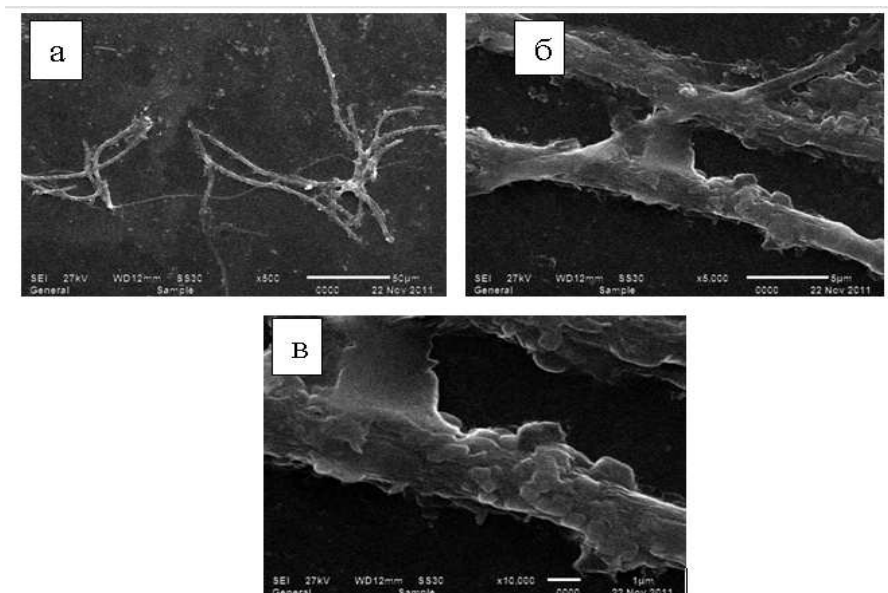


Рисунок 30. Вид поверхности клеток цианобактерий р. *Phormidium* после воздействия ионов никеля с концентрацией в растворе 2 мг/л при увеличении в: а – 500 раз, б – 5000 раз, в – 20000 раз

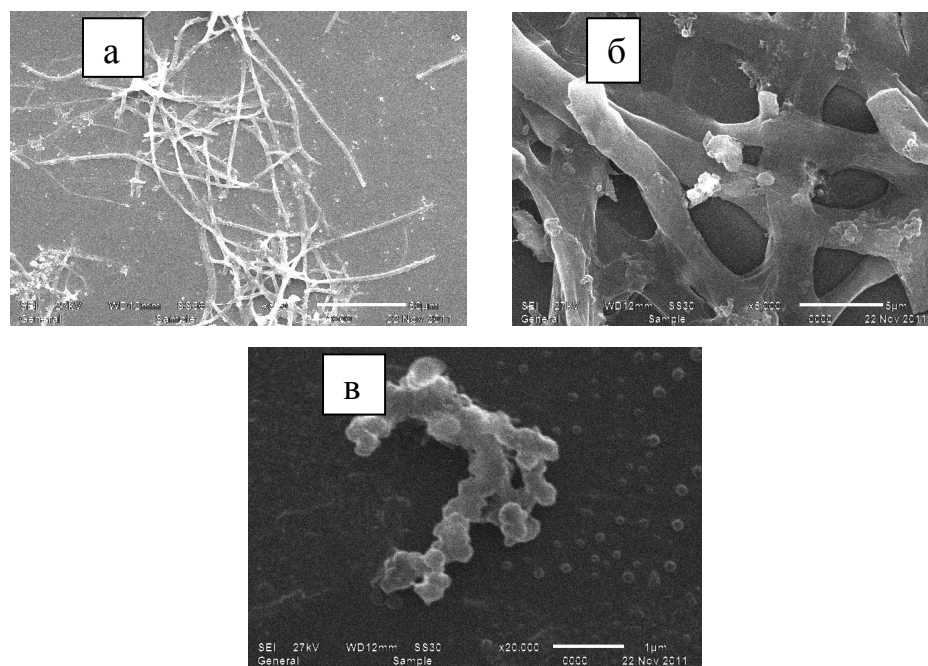


Рисунок 31. Вид поверхности клеток цианобактерий р. *Phormidium* после воздействия ионов никеля с концентрацией в растворе 20 мг/л при увеличении в: а – 500 раз, б – 5000 раз, в – 20000 раз

Таким образом, при воздействии ТМ на формидиевые пленки наблюдается резкое изменение морфологии клеток, что позволяет применять их в качестве биотест-организмов. Метод РЭМ открывает новые возможности для изучения изменения структуры клеток, происходящие под воздействием ТМ.

ГЛАВА V. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РАСТЕНИЙ В ПОЧВАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ МЕДЬЮ

Количество ТМ, поступающих в окружающую среду в результате техногенеза, в ряде случаев значительно превосходят уровень их естественного поступления (Ильин и др., 2001; Заварзин, 2003). При этом высокие концентрации ТМ в почве наблюдаются и в агроэкосистемах из-за оседания аэрозолей и пыли. Поэтому чрезвычайно актуальна проблема, связанная с биоремедиацией загрязненных почв, а также поиском МО, способных выполнять детекторные и сорбционные функции. Ранее было доказано, что ЦБ могут не только адаптироваться к экстремальным условиям, но и обладают возможностью аккумулировать и обезвреживать различные ксенобиотики, в том числе и ТМ (Мушак, 2006; Огородникова и др., 2010; Домрачева, 2011; Thompson et al., 2002; Volesky, May-Phillips, 2004; Chadkar et al., 2012). При этом отдельные штаммы ЦБ обладают полифункциональным действием по отношению к высшим растениям. Например, рекогносцировочные опыты, в которых обработка семян лядвенца рогатого проводилась ЦБ *Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. № 300, показали перспективность разработки цианобактериального препарата, предназначенного для увеличения продуктивности растения, что проявлялось прежде всего в повышении интенсивности образования клубеньков и накопления сухой массы в процессе вегетации у бобового растения (Домрачева и др., 2014).

В ходе данного микроделяночного опыта, заложенного на опытном поле ВГСХА в 2012 г., включающего 27 вариантов в 3-х кратной повторности, изучали реакцию аборигенной альго-циано-микрофлоры и высших растений на искусственное загрязнение почвы ионами Cu^{2+} . Почва дерново-подзолистая, среднесуглинистая; pH – 4,1; гумус – 1,86%; P_2O_5 – 145,5 мг/кг; K_2O – 127,5 мг/кг; S – 13,3 мг/кг; Cu – 0,22 мг/кг (фоновое содержание). Площадь учетной деланки – 0,24 м².

Для опыта в качестве объектов исследования были выбраны представители разных семейств: злаковые – пшеница сорта Ирень (*Triticum aestivum*), бобовые – горох сорта Лучезарный (*Pisum sativum*), крестоцветные – горчица белая (*Sinapis alba*), лабораторная всхожесть которых составила 92%, 99% и 95% соответственно.

Для предпосевной обработки семян использовали штаммы ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola*. Культуры ЦБ выращивали на среде Громова № 6 без азота в течение 3-х недель в люминостате при постоянной температуре (+25°) и освещении (3000 лк). Инокулят доводили до титра $8,3 \cdot 10^8$ кл./мл разбавлением исходной культуры дистиллированной водой. Перед посевом семена предварительно замачивали в инокуляте в течение 12 ч. Уборку урожая проводили через 15 (пшеница), 13 недель (горох) и 11 (горчица) недель после посева.

В качестве поллютанта использована медь в виде соли ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в различных концентрациях – 3 и 300 мг/кг, что соответствует 1 и 100 ПДК для почвы. Водные растворы токсикантов вносили в почву после посадки семян, проливая 10-15 см верхнего горизонта. Были выделены контрольные варианты для каждой серии опытов. Это варианты, в которых обработка семян ЦБ не проводилась (табл. 47).

Таблица 47

Схема микроделяночного полевого опыта

Сельскохозяйственная культура	Вариант	Концентрация меди в почве, мг/кг		
		0, 22 *	3	300
Пшеница	Без обработки	0, 22 *	3	300
	<i>Nostoc linckia</i>	0, 22	3	300
	<i>Fischerella muscicola</i>	0, 22	3	300
Горох	Без обработки	0, 22	3	300
	<i>Nostoc linckia</i>	0, 22	3	300
	<i>Fischerella muscicola</i>	0, 22	3	300
Горчица	Без обработки	0, 22	3	300
	<i>Nostoc linckia</i>	0, 22	3	300
	<i>Fischerella muscicola</i>	0, 22	3	300

Примечание: «*»- фоновое содержание меди в почве.

5.1. Исследование влияния возрастающих концентраций ионов меди (II) на почвенную альго-циано-микофлору

Медь – один из важных микроэлементов, недостаточное содержание которого в почвах негативно влияет на жизнедеятельность организмов. Но избыточные концентрации ТМ оказывают неблагоприятное воздействие, в том числе и на почву (Дмитриева, 1969; Давыдова, 1991; Рублева и др., 2002; Костина, 2004; Огородникова и др., 2010).

Почва – сложнейшая система, в состав которой входят МО, являющиеся одними из основных функциональных компонентов, участвующем в круговороте веществ (Гапочка, 1981). Почвенная микрофлора отличается высокой чувствительностью к воздействиям и первой реагирует на изменение параметров среды обитания. Изменение функциональных показателей почвенной биоты широко используется в целях экологической диагностики почвенных нарушений. При техногенном загрязнении именно почвенный микробоценоз осуществляет важную функцию детоксикации поллютантов (Мишустин и др., 1979; Ананьева, 2003; Киреева, 2009). Поэтому такие структурные показатели, как характер доминирования МО и преобладание различных трофических групп, могут характеризовать устойчивость почв, их способность справляться с факторами антропогенного воздействия.

5.1.1. Влияние меди на развитие почвенной альго-циано-микофлоры под посевами пшеницы сорта Ирень

Образцы почвы для количественного анализа альго-циано-микофлоры были отобраны с глубины 0-5 см во время уборки урожая в сентябре, через 15 недель после посева. При прямом учете под микроскопом выделены следующие группы МО: ЦБ – гетероцистные (ГЦ), безгетероцистные (БГЦ), зеленые одноклеточные и диатомовые водоросли, микромицеты с окрашенным и бесцветным мицелием.

При техногенном загрязнении именно почвенный микробоценоз осуществляет важную функцию детоксикации поллютантов (Мишустин и

др., 1979; Ананьева, 2003; Киреева, 2009; Евдокимова, 2014). Поэтому такие структурные показатели, как характер доминирования МО и преобладание различных трофических групп, могут характеризовать устойчивость почв, их способность справляться с факторами антропогенного воздействия. Изучено влияние возрастающих концентраций Cu на структуру фототрофных почвенных сообществ под посевами. Так, в варианте с концентрацией Cu в почве 3 мг/кг происходят несущественные изменения в составе фототрофного сообщества по сравнению с контрольным вариантом: в первую очередь это проявляется в возрастании численности одноклеточных зеленых водорослей с сохранением в прокариотном компоненте ГЦ и БГЦ форм ЦБ. Однако возрастание концентрации Cu до 300 мг/кг существенно увеличивает степень доминирования в сообществе ЦБ до 82,8 % с элиминацией ГЦ форм (рис. 6). Таким образом, БГЦ ЦБ являются наиболее устойчивыми МО к действию ТМ, увеличивая свою численность даже при высоких концентрациях Cu^{2+} .

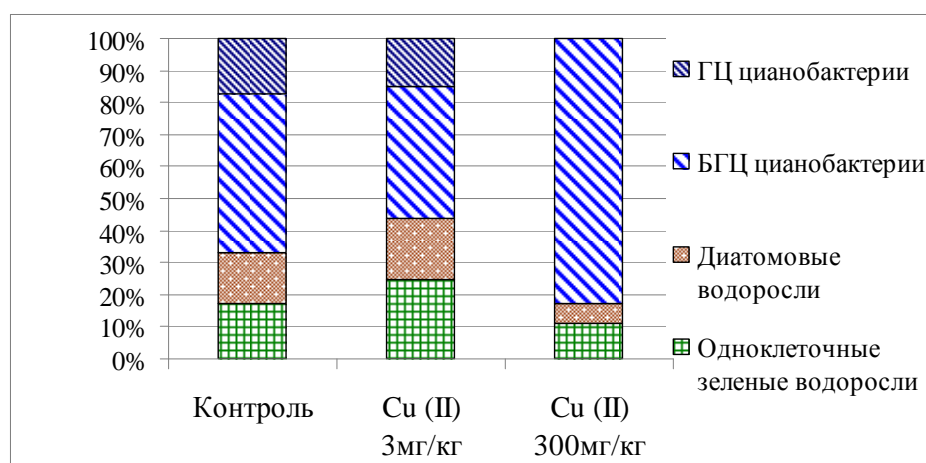


Рисунок 32. Влияние возрастающих концентраций меди на структуру фототрофных популяций, %

Диатомовые водоросли обнаружены во всех пробах, т.к. данные почвы являются хорошо увлажненными. Содержание диатомей в контроле и при концентрации Cu 3 мг/кг практически одинаково по абсолютному значению – 600 и 670 тыс. кл./г (в процентном отношении – 15,56 и 19,14%). При 300 мг/кг их численность падает до 200 тыс. кл./г (6 % от общего числа фототрофов).

Изменение состава доминирующих группировок фототрофов, которое происходит под влиянием возрастающих концентраций Cu^{2+} , практически не влияет на общую численность популяций этих МО (табл. 48).

Таблица 48

Влияние возрастающих концентраций меди на численность фототрофных организмов, тыс. кл./г

Контроль	Cu^{2+} 3 мг/кг	Cu^{2+} 300 мг/кг
3840±750	3500±400	3297±370

При этом численность прокариот (ЦБ) в образцах загрязненной почвы преобладает над численностью эукариот (водорослей) (табл. 49). Например, при концентрации в почве ионов меди (II) 3 мг/кг доля эукариот составляет 33,07%, а при максимальной концентрации ТМ – 17,20%. Таким образом, наблюдается увеличение вклада цианобактериального компонента в структуру фототрофных популяций при увеличении концентрации Cu^{2+} в почве. Данный факт явно свидетельствует о повышенной устойчивости прокариотных фототрофов к «медному» стрессу по сравнению с эукариотными фотосинтетиками.

Таблица 49

Структура популяций фототрофных комплексов, %

Варианты	Водоросли (эукариоты)	Цианобактерии (прокариоты)
Контроль	33,07	66,93
Cu^{2+} 3 мг/кг	44,00	56,00
Cu^{2+} 300 мг/кг	17,20	82,80

Уровень химического загрязнения почвы можно определить также при микологической индикации, используя показатель соотношения в структуре популяций форм микромицетов с окрашенным и неокрашенным мицелием (рис. 33). Большим количеством грибов с неокрашенным мицелием отличается почва в контроле – 67%, а наименьшим – вариант 100 ПДК Cu^{2+} (около 25%). Наблюдаемая тенденция заключается в уменьшении доли грибов с бесцветным мицелием и возрастанием доли темноокрашенных форм при увеличении содержания меди в почве.

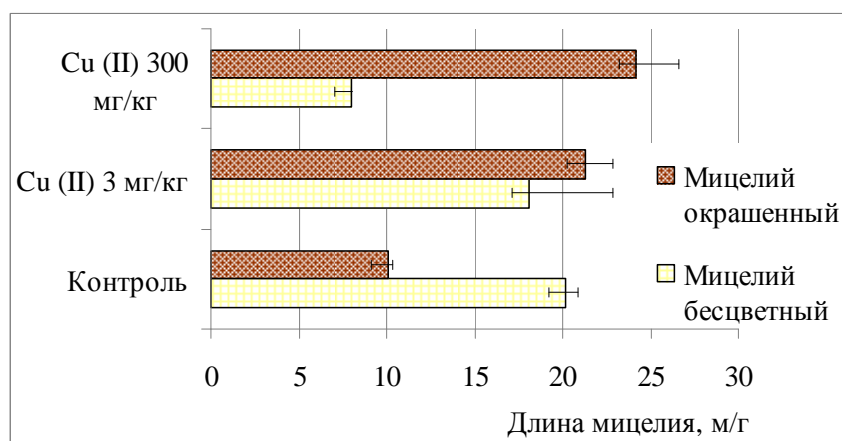


Рисунок 33. Структура популяций микромицетов, м/г

При анализе количественных характеристик комплексов микромицетов установлено, что по суммарной длине мицелия максимальный показатель наблюдается в варианте с концентрацией меди 3 мг/кг – 39,4 м/г, а минимальный – в контроле (30,3 м/г). В варианте с концентрацией меди в почве 300 мг/кг длина мицелия составляет 32,2 м/г.

Таким образом, участок с высоким содержанием Cu в почве (300 мг/кг) характеризуется экологической напряженностью, о чем может свидетельствовать неравномерное развитие группировок. Возрастание концентрации ТМ приводит к существенному возрастанию доли меланизированных микромицетов. Из 2-х испытанных концентраций Cu одна – 300 мг/кг, в той или иной степени ингибирует развитие отдельных групп альго-микофлоры. В то же время концентрация меди, равная 3 мг/кг, практически не оказывает угнетающего действия на исследуемые группы МО.

5.1.2. Изучение развития цианобактерий под различными культурами в почве, загрязненной ионами меди (II)

Многочратно отмечалось, что загрязнение почвы ТМ сказывается на развитии и функционировании микробных группировок. Чтобы иметь четкие представления о специфике действия конкретных ТМ на почвенные МО, обычно проводят полевые опыты, в ходе которых в «чистую» почву вносят возрастающие концентрации определенных ТМ.

Целью этого опыта было изучение состояния популяций ЦБ, вегетирующих в почве, загрязненной Cu^{2+} в концентрациях 3 и 300 мг/кг. Образцы почв для микробиологического анализа отбирали с глубины 0-5 см. Покровные культуры: горчица белая и пшеница.

Показатели численности клеток ЦБ в контрольном варианте в почве под пшеницей и горчицей различаются с превалянием этого показателя под горчицей (рис. 34). Это вполне можно связать с особенностями строения корневой системы однодольных и двудольных растений. Угнетающее действие Cu^{2+} на развитие ЦБ наиболее четко проявляется в почве под горчицей. При возрастании концентрации Cu^{2+} с 3 до 300 мг/кг происходит плавное снижение численности популяций ЦБ от 4230 тыс.кл./г в контроле – к 3370 тыс.кл./г (3 мг/кг) и 1230 тыс.кл./г (300 мг/кг). Наблюдается следующая тенденция – чем выше концентрация Cu^{2+} в почве, тем меньше численность ЦБ ($r_{\text{П}}=0,96$). В то же время в почве под пшеницей существенного угнетения развития ЦБ не происходит. Во всех вариантах численность этой группы МО колеблется в пределах 2-2,5 млн. кл./г.

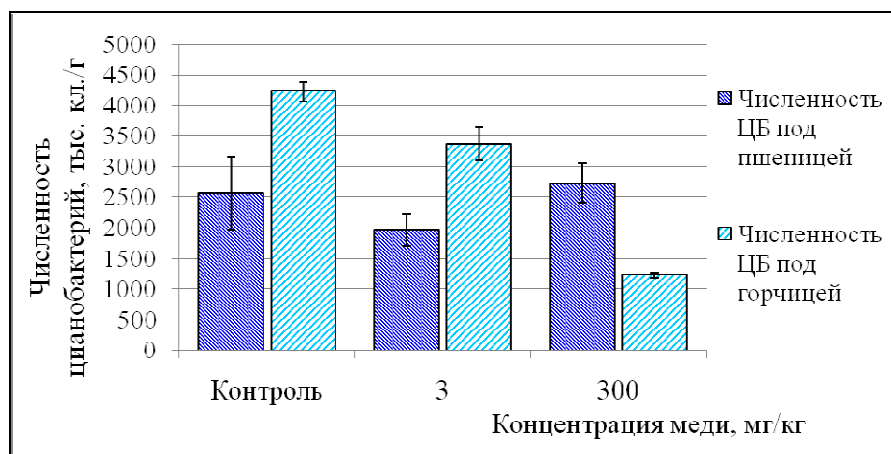


Рисунок 34. Численность цианобактерий в почве под посевами пшеницы и горчицы, тыс. кл./г

Таким образом, в полевых условиях под растениями со стержневой корневой системой (горчица) проявляется практически прямолинейная зависимость между концентрацией Cu^{2+} и численностью клеток в популяции ЦБ.

5.1.3. Влияние возрастающих концентраций ионов меди (II) на развитие почвенных микромицетов под посевами гороха сорта Лучезарный

В биоиндикационных исследованиях по характеру ответных реакций различных групп микроорганизмов судят о наличии почвенного гомеостаза или степени его нарушения. Яркими представителями микробов-индикаторов являются почвенные микромицеты (Марфенина, 2005; Домрачева, 2011). Прямое микроскопирование почвенной суспензии позволяет без проведения видовой идентификации грибов дифференцировать их популяции на формы с бесцветным и меланизированным мицелием, а также проводить на этих же мазках прямой количественный учет микромицетов, исходя из численности фрагментов мицелия. Меланизация мицелия в экспериментальной экологии рассматривается как способ адаптации организмов к перенесению неблагоприятных условий природного или антропогенного происхождения. Поэтому возрастание относительного обилия пигментированных грибов служит сигналом о начинающемся неблагополучии почвы при изучении сельскохозяйственных или техногенных экосистем.

Цель данного опыта – изучение влияния возрастающих концентраций ионов меди (3 и 300 мг/кг) на развитие почвенных микромицетов в пахотной почве под посевами гороха.

При прямом микроскопическом учете микромицетов было установлено, что при возрастании концентрации Cu^{2+} в почве происходят существенные изменения в состоянии популяций грибов. В первую очередь, это проявляется в увеличении общей численности грибных зачатков (пропагул) в вариантах с максимальной концентрацией ГМ (табл. 50). Так, по сравнению с контролем внесение в почву Cu^{2+} в дозе 300 мг/кг приводит к возрастанию фрагментов мицелия в 8,5 раз соответственно. Соответственно, между этими показателями наблюдается высокая степень прямолинейной за-

висимости, о чем свидетельствует коэффициент корреляции, равный 0,9963.

Таблица 50

Влияние возрастающих концентраций меди на численность микромицетов
в почве

Вариант	Численность фрагментов мицелия (тыс./г)		Всего спор (тыс./г)
	бесцветных	окрашенных	
Контроль	900±100	430±50	1330±150
Cu ²⁺ 3 мг/кг	600±100	1770±200	2370±300
Cu ²⁺ 300 мг/кг	1770±300	9570±800	11340±1100

Однако это обилие не сопровождается нарастанием грибной биомассы, так как загрязнение почвы Cu²⁺ приводит к морфологической аномалии – резкому уменьшению длины спор. Если в контроле средняя длина мицелиального фрагмента колебалась в пределах 32-40 мкм, то при дозе Cu²⁺ 300 мг/кг этот показатель был всего 3-6 мкм. Подобное стремительное измельчение клеток ранее отмечалось для бактерий, развивающихся в загрязненных почвах, независимо от характера загрязнения (Лысак, 2010). Установлено, что численность и доля наночастиц МО в загрязненных почвах, в том числе загрязненных и Cu²⁺, выше, чем в незагрязненных. Вероятно, способность бактерий переходить в состояние наночастиц является одним из возможных механизмов сохранения жизнеспособности в неблагоприятных условиях ОС.

Корреляция между степенью загрязнения почвы и возрастанием численности грибов, возможно, обусловлена тем, что в загрязненных почвах происходит стимуляция размножения специфических групп микромицетов. Ранее отмечалось, что в грибном сообществе загрязненной почвы появляются необычные для нормальных условий, устойчивые к ТМ виды микромицетов, многие из которых обладают фитотоксическими свойствами (Левин и др., 1989). Эффект фитотоксичности сказывается как на прорастании семян, так и на развитии проростков. Подобные явления были зарегистрированы в вегетационных и полевых опытах только при концентрациях ТМ в 300 раз выше фоновых. Возможное снижение урожая сельскохозяйствен-

ных культур в загрязненных почвах может определяться не только непосредственным действием ТМ, но и возросшей токсигенной активностью микобиоты.

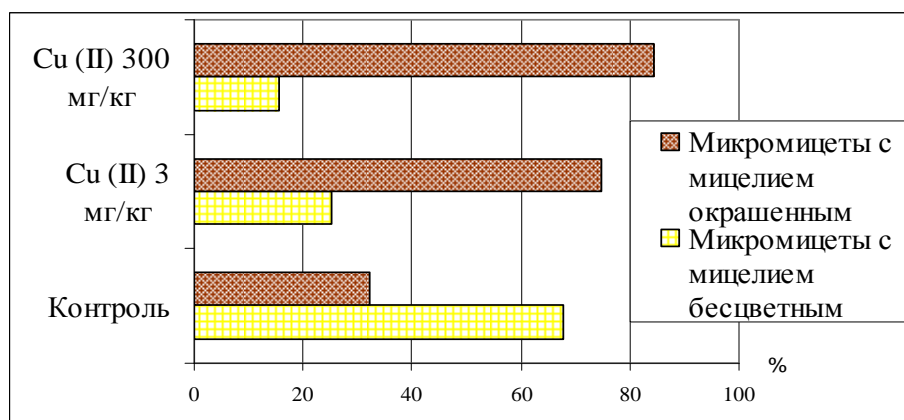


Рисунок 35. Влияние возрастающих концентраций меди на соотношение грибов с бесцветным и окрашенным мицелием, %

Еще один аспект влияния Cu^{2+} на микокомплексы проявляется в изменении структуры их популяций (Grube et al., 2011). Это проявляется в резком сокращении форм с бесцветным мицелием и возрастанием доли темноокрашенных грибов (рис. 35). Так, при фоновом содержании меди в почве (контроль) меланизированные грибы составляют всего 32,3% от общего количества. При максимальной концентрации (300 мг/кг) этот показатель достигает более 80% с коэффициентом корреляции Пирсона $r_{\text{П}}=0,65$.

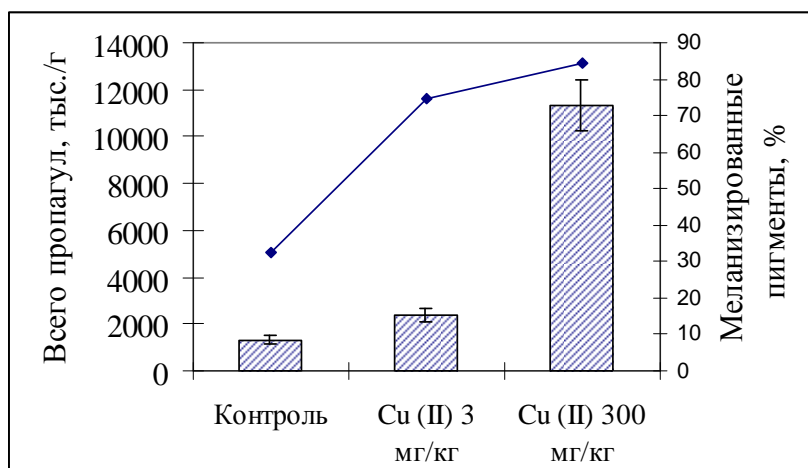


Рисунок 36. Влияние возрастающих концентраций меди на численность микромицетов и относительное обилие меланизированных форм грибов

Выявленная закономерность снова подтверждает давно установленный факт: повышенной толерантностью к различным экстремальным и

стрессовым факторам среды обладают грибы, вырабатывающие соединения (меланины), способные в своих клетках связывать ТМ и другие поллютанты в нетоксичные комплексы. Следовательно, доминирование меланизированных микромицетов в почвенных микоценозах можно рассматривать как индикационный признак на загрязнение почвы.

Таким образом, исследования по влиянию возрастающих концентраций Cu^{2+} на развитие почвенных микромицетов, проведенные в полевых условиях показали, что данный ТМ является сильнейшим стресс-фактором для микобиоты (рис. 36). Ионы Cu^{2+} провоцирует следующие изменения в состоянии микокомплексов: резкое увеличение численности пропагул в почве; усиление фрагментации мицелия, которое сопровождается снижением их средней длины; стремительная меланизация грибных популяций. Подобные изменения микокомплексов, вероятно, вызваны серией адаптационных реакций, направленных на выживание в изменившихся условиях ОС.

5.2. Исследование влияния ионов меди (II) на урожайность культур высших растений при предпосевной цианобактериальной обработке семян

Как известно, микроэлементам принадлежит значительная биологическая роль в ускорении физиологических реакций, происходящих в клетках, что в свою очередь влияет на процессы роста и развития (Пейве, 1960). Например, применение медных удобрений сказывается на повышении урожайности и на качестве сельскохозяйственной продукции. Так, увеличивается сахаристость сахарной свеклы, растет количество белка в зерне, повышается устойчивость озимой пшеницы к полеганию, улучшаются технологические качества волокна конопли и т.д. (Добролюбский, 1956; Школьник, Макарова, 1957; Дробков, 1958; Булыгин, 2007). Под влиянием такого элемента, как кобальт, повышается урожайность сахарной свеклы, озимой ржи, ячменя, льна (Анспок, 1990; Битюцкий, 1999).

В работе использовали семена пшеницы, гороха и горчицы. Инокуляцию семян проводили 2-мя штаммами ЦБ – *N. linckia* и *Fisch. muscicola*. В почву вносили Cu^{2+} с концентрацией 3 и 300 мг/кг. Целью было изучение влияния Cu^{2+} на урожайность исследуемых культур, выращиваемых в условиях предпосевной цианобактериальной обработки семян.

5.2.1. Влияние цианобактериальной обработки семян на урожайность пшеницы сорта Ирень при выращивании в условиях загрязнения почвы медью

Определение урожайности пшеницы показало, что предпосевная обработка семян как ЦБ *Fisch. muscicola*, так и ЦБ *N. linckia* ведет к стимуляции урожайности культуры по сравнению с контролем. Эта закономерность прослеживается и при увеличении содержания Cu^{2+} в почве (рис. 37).

На уровне контроля и при концентрации Cu^{2+} 3 мг/кг показатели урожайности культур, обработанных ЦБ, сходны и колеблются от 70,6 г/м² (*Fisch. muscicola*) до 73,6 г/м² (*N. linckia*) в случае контроля, и от 69,2 г/м² (*Fisch. muscicola*) до 78,7 г/м² (*N. linckia*) при минимальной исследуемой концентрации поллютанта. Полученные данные свидетельствуют о том, что при низких концентрациях ТМ инокуляция семян ЦБ *N. linckia* приводит к увеличению урожайности до 1,7 раза по сравнению с контролем.

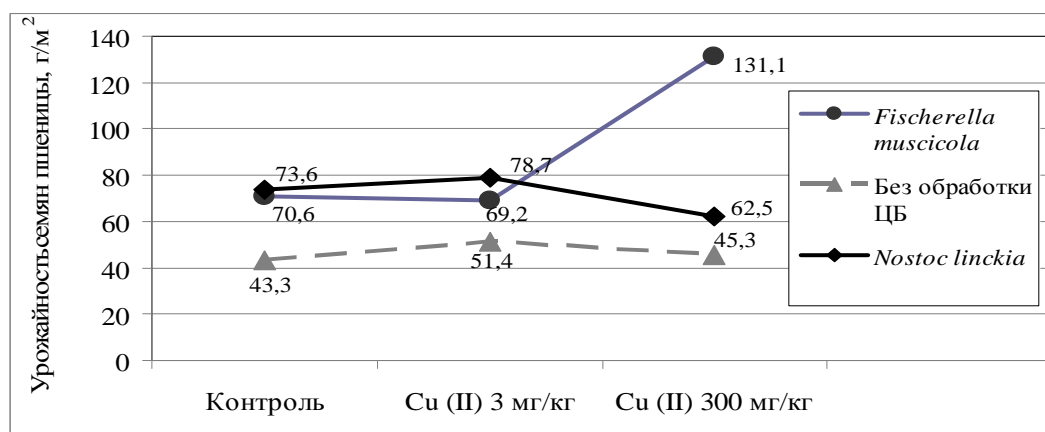


Рисунок 37. Влияние цианобактериальной обработки на урожайность семян пшеницы при выращивании в медьзагрязненной почве, г/м²

В случае высокой концентрации соли меди урожайность зерна пшеницы при обработке ЦБ *Fisch. muscicola* возрастает на 189 % при 100 ПДК относительно контроля. Обработка семян пшеницы ЦБ *N. linckia* при высоких концентрациях поллютанта также влияет на показатели урожайности: +38 %.

В целом, при обработке семян пшеницы ЦБ в обоих случаях значения урожайности выше, чем в контроле. А в варианте с обработкой семян ЦБ *Fisch. muscicola* наблюдается и зависимость урожайности от концентрации Cu^{2+} в почве – с повышением дозы ТМ урожайность культуры увеличивается ($r_{\text{II}}=0,9996$)

5.2.2. Действие ионов меди (II) на урожайность гороха сорта Лучезарный при цианобактериальной обработке семян

В опытах с горохом показано, что действие растущих концентраций Cu^{2+} неблагоприятно сказывается на урожайности гороха (рис. 38). Наблюдается снижение урожайности при увеличении концентрации ТМ (до 60% в контроле). Это, как отмечалось выше (раздел 5.1.3), может быть не только следствием действия ТМ, но и накоплением в почве токсинов грибного происхождения.

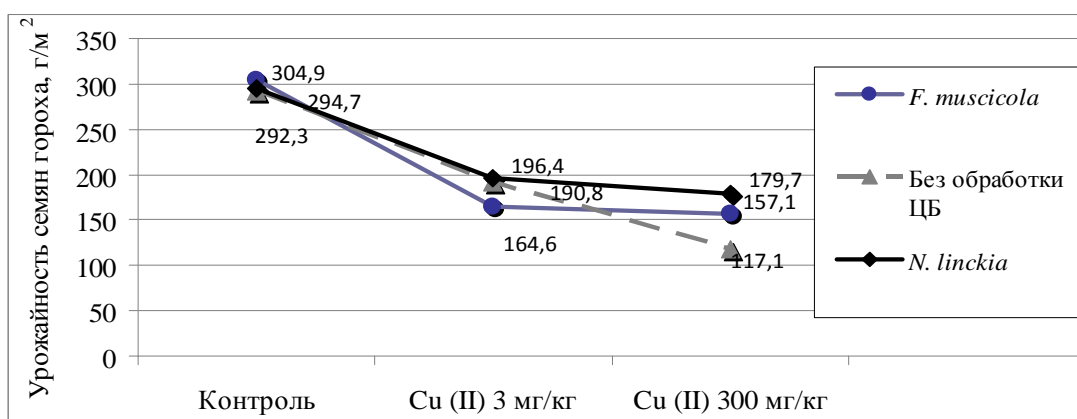


Рисунок 38. Влияние цианобактериальной обработки семян на урожайность гороха в медьзагрязненной почве, г/м²

При высоких дозах Cu^{2+} (300 мг/кг) горох обработка семян гороха ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicol*, проявляет защитный эффект, который заключается в меньшем падении урожайности по сравнению с контролем – на 54 и

34% соответственно. В целом, при цианобактериальной обработке семян гороха наблюдается уменьшение урожайности семян в условиях «медного стресса».

5.2.3. Изучение влияния цианобактериальной инокуляции семян горчицы белой на урожайность при выращивании в медьзагрязненной почве

В исследовании установлено, что обработка семян горчицы белой ЦБ *Fisch. muscicola* не приводит к уменьшению показателей урожайности культуры (рис. 39). При концентрации Cu^{2+} 3 мг/кг значения урожайности семян горчицы при обработке ЦБ *N. linckia* остаются на одном уровне с контролем. Однако увеличение дозы ТМ приводит к стимуляции роста урожайности культуры до 278,8 г/м² при 100 ПДК (на 97% выше, чем в контроле). Таким образом, обработка семян горчицы белой ЦБ *N. linckia* оказывает стимулирующее и ростактивирующее действие при высоких дозах ТМ ($r_{\text{П}}=0,8469$).

По полученным данным видно, что обработка семян горчицы ЦБ *Fisch. muscicola* к увеличению урожайности не приводит – 216,4 г/м² – в контроле, 138,2 г/м² – 3 мг/кг, 141,8 г/м² – 300 мг/кг. Наблюдается противоположный эффект: с увеличением дозы ТМ снижается урожайность культуры.

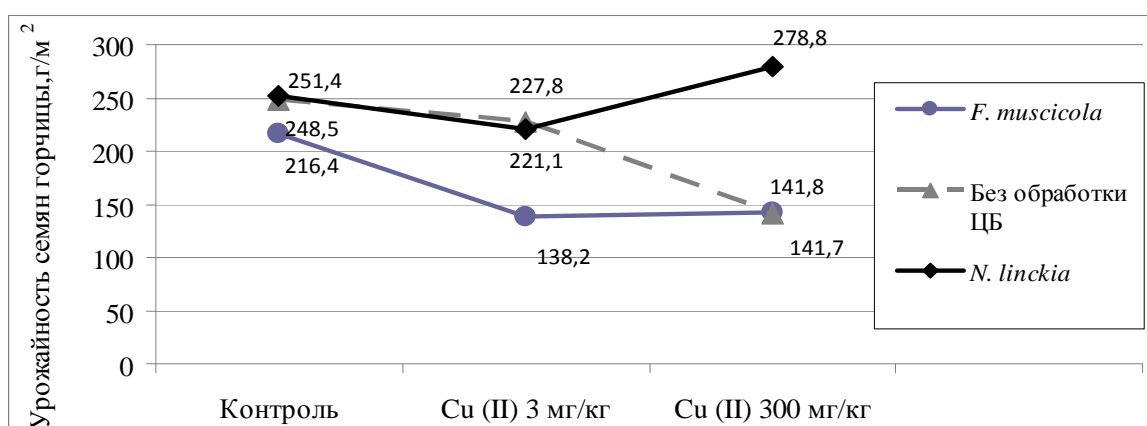


Рисунок 39. Влияние цианобактериальной обработки семян на урожайность горчицы при выращивании в медьзагрязненной почве, г/м²

Таким образом, доказано, что возрастающие концентрации ТМ неоднозначно влияют на урожайность горчицы. Так, концентрация Cu^{2+} при предварительной инокуляции семян ЦБ. Однако, повышение содержания Cu^{2+} в почве до 300 мг/кг парадоксально приводит к росту этого показателя в варианте с *N. linckia*. Получен рекордный урожай – 278,8 г/м², что говорит о ростактивирующем действии данной ЦБ.

5.3. Действие ионов меди (II) на уровень накопления антоциановых пигментов высшими растениями

Антоцианы (флавоноиды) – природные красящие вещества из группы флавоноидов – сильные антиоксиданты и вторичные метаболиты. Антоцианы нужны не только для того, чтобы яркой окраской привлекать насекомых-опылителей и распространителей семян, но и для борьбы с различными типами стрессов. По содержанию в растении антоцианов можно судить о степени токсичности загрязнителей в ОС. При увеличении биосинтеза антоциановых пигментов и, соответственно, снижении окислительных повреждений наблюдается неспецифическая реакция на стресс. Так, растения, содержащие большое количество антоцианов, обладают повышенной устойчивостью к загрязнению воздуха газами городской среды (Масленников, Бородей, 2001).

Определение антоциановых пигментов проводили в листьях растений, расположенных в 30 см от поверхности почвы, в возрасте культур – 9 недель.

5.3.1. Влияние цианобактериальной обработки на содержание антоцианов в листьях пшеницы сорта Ирень в медьзагрязненной почве

Опыты показали, что цианобактериальная обработка семян пшеницы в вариантах на фоновых территориях не приводит к стимуляции выработки антоциановых пигментов (рис. 40).

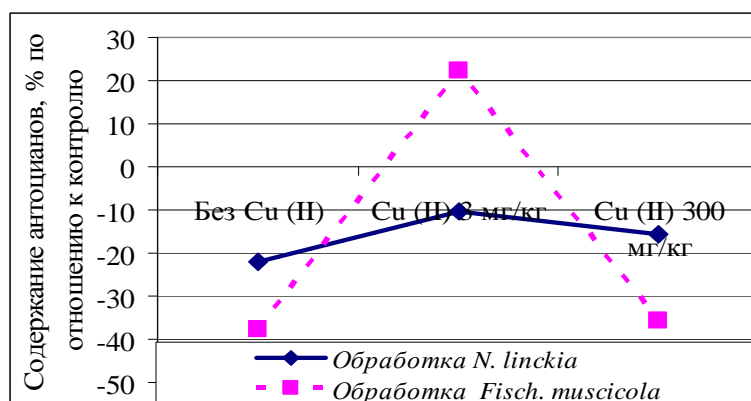


Рисунок 40. Влияние ионов меди (II) на содержание антоциановых пигментов в листьях пшеницы, инокулированной ЦБ (в % от контроля)

Напротив, наблюдается спад содержания пигментов до 21,9% (*N. linckia*) и до 37,5% (*Fisch. muscicola*) по сравнению с контролем. Вероятно, это связано с малым содержанием Cu^{2+} в почве фоновой территории – $0,22 \pm 0,02$ мг/кг.

При высоких концентрациях Cu^{2+} (300 мг/кг) также замечено снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в листьях пшеницы – 15,6% и 35,6% к контролю при обработке ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola*.

Под действием высоких концентраций ТМ наблюдается неспособность к накоплению в тканях антоцианов. Вероятно это обусловлено тем, что в стрессовых условиях в растениях генерируются активные формы кислорода, которые могут вызвать в клетках окислительные повреждения многих веществ, включая липиды мембран (Тарчевский, 2002). При концентрации меди в почве 3 мг/кг прослеживается усиление интенсивности защитных окислительных процессов, которое направлено на снижение окислительных повреждений под действием стресс-факторов. Так, предпосевная обработка семян пшеницы ЦБ *Fisch. muscicola* повышает содержание антоцианов на 22,5% выше контроля.

Другими авторами, так же, как и нами, установлено, что разные по строению и свойствам поллютанты (Pb, нефть) повышает уровень антоциановых пигментов в растительных тканях (Басалаева, Огородникова, 2010).

5.3.2. Влияние предпосевной цианобактериальной обработки семян на содержание антоцианов в горохе сорта Лучезарный при условиях загрязнения почвы медью

Уровень накопления антоциановых пигментов зависит от концентрации ТМ в почве. Как и в варианте с пшеницей, наиболее интенсивное образование пигментов в листьях гороха прослеживается в вариантах с обработкой семян *Fisch. muscicola* и содержанием меди в почве 3 мг/кг (рис. 41). Наблюдается запуск антиоксидантной системы, который выражается в накоплении антоцианов и является ответной реакцией организма на окислительный стресс.

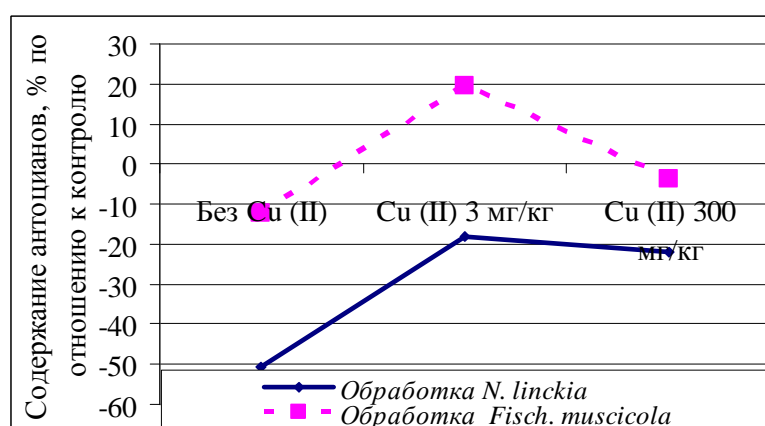


Рисунок 41. Влияние ионов меди (II) на содержание антоциановых пигментов в листьях гороха, инокулированного ЦБ (в % от контроля)

В контроле зафиксированы самые низкие значения пигментов как при обработке ЦБ *Fisch. muscicola*, так и *N. linckia*: -50,6 % и -12,4 % ниже контроля. Значения ниже фонового наблюдаются и в варианте с содержанием Cu^{2+} в почве 300 мг/кг. Данное значение связано с разрушением большого количества веществ, которые отвечают за целостность клетки. Но в целом, результаты выше, чем в контрольном варианте.

Таким образом, инокуляция семян гороха ЦБ *Fisch. muscicola* приводит к более интенсивному накоплению веществ с антиоксидантными свойствами в процессе вегетации – антоцианов растений.

5.3.3. Влияние ионов меди (II) при цианобактериальной инокуляции семян горчицы белой на уровень накопления антоцианов в листьях растений

Максимальные значения накопления антоцианов отмечаются у растений в почве фоновой территории при обработке семян горчицы ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola* – -47,92% и 39,6% соответственно (рис. 42).

Прослеживается общая тенденция: с увеличением концентрации Cu^{2+} уменьшается накопление антоцианов в горчице. Это подтверждается и коэффициентом корреляции Пирсона: $r_{\text{П}}(N. linckia) = -0,7146$ и $r_{\text{П}}(Fisch. muscicola) = -0,9244$. Вероятно, это обусловлено тем, что происходит усиление токсического эффекта Cu^{2+} , который заключается в повышении извлечения Cu^{2+} горчицей в комплексе с МО (раздел 5.4). Таким образом, ассоциация горчицы белой, ЦБ *Fisch. muscicola* и *N. linckia* вызывает увеличение количества антоцианов, что может быть обусловлено индивидуальными взаимоотношениями исследуемых ЦБ и высшего растения. Также усиление фиторемедиационных способностей *S. alba* при цианобактериальной обработке может быть вызвано адаптационными перестройками растения. Падение уровня пигментов с увеличением роста ТМ в почве может быть вызвано нарушением целостности мембран, инактивацией ферментов и разрушением нуклеиновых кислот, поскольку под действием ТМ в клетках инактивируются окислительные процессы (Полесская, 2007).

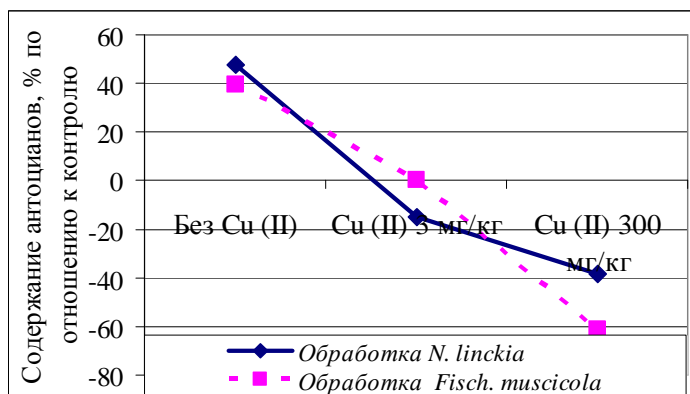


Рисунок 42. Влияние ионов меди (II) на содержание антоциановых пигментов в листьях горчицы, инокулированной ЦБ (в % от контроля)

Таким образом, предпосевная цианобактериальная инокуляция семян воздействует на содержание антоциановых пигментов в растении и является показателем уровня извлечения меди из почвы.

5.4. Исследование влияния цианобактериальной обработки семян высших растений на уровень сорбции ионов меди (II) из загрязненной почвы

В данной серии опытов было изучено влияние ЦБ *Fisch. muscicola* и *N. linckia* на уровень накопления ионов Cu^{2+} в семенах и вегетативной массе пшеницы сорта Ирень, гороха сорта Лучезарный и горчицы белой при выращивании в почве, искусственно загрязненной медью.

Показано, что содержания ТМ в семенах и вегетативной массе в случае предпосевной обработки семян пшеницы ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola* в семенах выше, чем в вегетативной массе во всех вариантах (Табл. 51, Приложение, табл. 2 и 3).

Таблица 51

Влияние предпосевной инокуляции семян на вынос ионов меди (II) растениями из почвы

Культура, вариант		Вегетативная масса	Семена	Всего	
Пшеница	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	1,9±0,4	8±1,81,6	9,9±2,2
		<i>Nostoc linckia</i>	2,2±0,5	7,3±1,7	9,5±2,2
		<i>Fischerella muscicola</i>	2,9±0,7	7,2±1,8	10,1±2,3
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	5,3±1,2	8,7±2,0	14±3,2
		<i>Nostoc linckia</i>	2,8±0,6	8,4±1,9	11,2±2,5
		<i>Fischerella muscicola</i>	8,7±2	8±1,8	16,7±3,8
Горох	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	19,37±0,13	5,20±0,00	24,57±0,13
		<i>Nostoc linckia</i>	5,91±0,12	4,76±0,23	10,67±0,35
		<i>Fischerella muscicola</i>	16,26±0,19	5,98±0,04	22,24±0,23
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	44,06±0,18	6,66±0,05	50,72±0,23
		<i>Nostoc linckia</i>	8,34±0,01	5,21±0,16	13,56±0,17
		<i>Fischerella muscicola</i>	48,00±00,00	5,45±0,07	53,45±0,07
Горчица	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	2,3±0,5	4±0,9	6,3±1,4
		<i>Nostoc linckia</i>	2,9±0,7	4±1	6,9±1,7
		<i>Fischerella muscicola</i>	2,4±0,5	3,2±0,7	5,6±1,2
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	2,7±0,6	3±0,7	5,7±1,3
		<i>Nostoc linckia</i>	3,2±0,7	3,9±0,9	7,1±1,6
		<i>Fischerella muscicola</i>	3,3±0,8	5,4±1,3	8,7±2,1

5.4.1. Влияние цианобактериальной обработки семян на уровень накопления ионов меди (II) в пшенице сорта Ирень

В контрольном варианте с фоновым содержанием Cu^{2+} , равным 0,22 мг/кг и варианте с дозой ТМ 3 мг/кг значения находятся примерно на одном уровне – 4,55 и 2,02% (рис. 43). В варианте с внесением Cu^{2+} в почву в концентрации 300 мг/кг отмечаются максимальные значения сорбции – +19,29% к контролю. В целом, в вариантах с предварительной обработкой семян ЦБ *Fisch. muscicola* прослеживается положительная динамика в извлечении ТМ из почвы.

Противоположные результаты наблюдаются в вариантах с обработкой семян пшеницы ЦБ *N. linckia* – с увеличением концентрации ТМ в почве уровень сорбции пшеницы падает ($r_{\text{II}} = -0,8865$). Таким образом, происходит снижение уровня поступления Cu^{2+} в наземную часть растения благодаря защитному эффекту ЦБ при высоких дозах ТМ, которое заключается в блокировании поступления ионов Cu^{2+} из почвы в надземную часть растения.

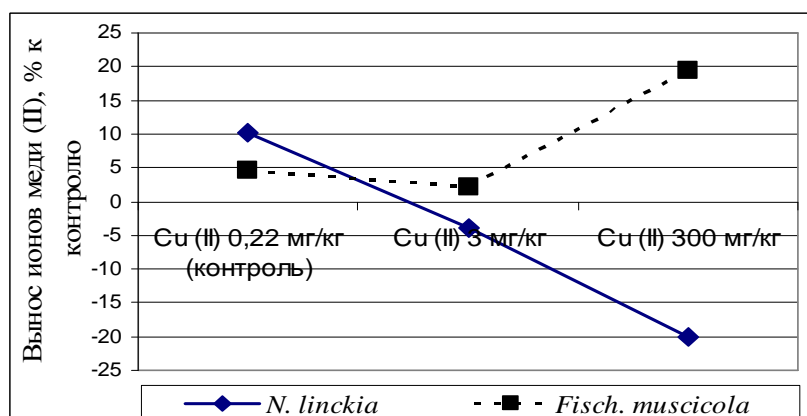


Рисунок 43. Содержание ионов меди (II) в надземной части пшеницы, инокулированной ЦБ, % к контролю

В целом, обработка семян пшеницы ЦБ *Fisch. muscicola* повышает уровень сорбции растением ионов ТМ, а ЦБ *N. linckia*, наоборот обладает защитными свойствами в условиях загрязнения почвы Cu .

5.4.2. Влияние обработки семян гороха сорта Лучезарный цианобактериями на уровень поступления ионов меди (II) в надземную часть

Химический анализ надземной массы гороха показал, что содержание подвижных форм ионов Cu^{2+} в вегетативной массе больше, чем в семенах (Приложение, табл. 2 и 3). В ходе исследования показана зависимость между концентрацией Cu^{2+} в почве и выносом в наземную часть растения при использовании ЦБ *N. linckia*: при увеличении содержания ТМ уменьшается вынос металла ТМ растениями ($r_{II} = -0,7920$) (рис. 44). Например, в фоновой территории, при концентрации ТМ в почве 3 и 300 мг/кг значения следующие: -29,0%; -56,6% и 73,3% к контролю. Обработка семян гороха ЦБ *Fisch.muscicola*, так же, как обработке *N. linckia*, приводит к уменьшению поступления Cu^{2+} в наземную часть растения по сравнению с контролем. В области низких концентраций: -1,1% и -9,5% (фон и 3 мг/кг соответственно). Но высокие дозы ТМ ведут к большему выносу Cu^{2+} из почвы горохом. Вероятно, это связано с тем, что, встраиваясь в растение, ЦБ являются проводниками для ионов ТМ из почвы (Баулина, 2010).

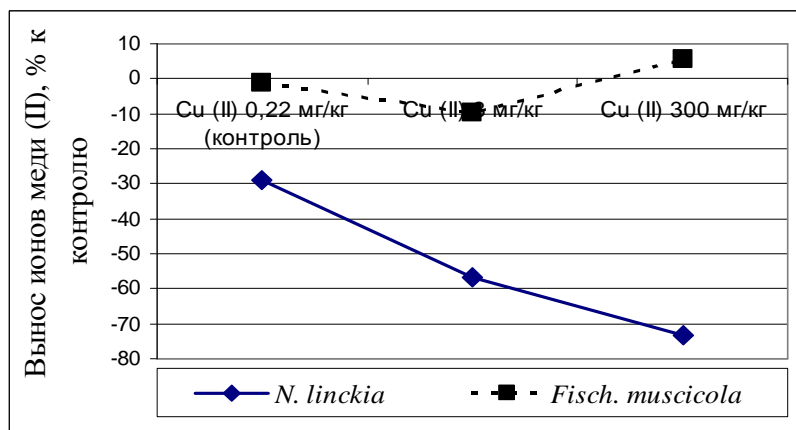


Рисунок 44. Содержание ионов меди (II) в надземной части гороха, инокулированного ЦБ, % к контролю

Безусловно, необходимо дальнейшее изучение данного явления, отражающего степень возникновения симбиотических отношений между конкретным видом ЦБ и конкретным растением.

5.4.3. Влияние цианобактериальной обработки семян горчицы белой на уровень поступления ионов меди (II) в вегетативную массу и семена горчицы белой

При химическом анализе урожая горчицы установлено, что содержание Cu^{2+} в вегетативной массе не превышает значения ПДК почти во всех вариантах, в отличие от семян (Приложение, табл. 2 и 3). Необходимо отметить, что Cu^{2+} перераспределяется в наземной части растения неравномерно, особенно концентрируясь в семенах.

Определение концентрации ТМ атомно-абсорбционным методом в наземной массе горчицы показало, что повышение концентрации Cu^{2+} в почве приводит к возрастанию извлечения ТМ культурой в вариантах с предпосевной обработкой семян ЦБ (рис. 45). При этом сорбционная активность различных ЦБ разная. Так, при использовании *N. linckia* при 300 мг/кг вынос Cu^{2+} растением увеличивается на 24,6% ($r=0,8184$), а при инокулировании семян *Fisch. muscicola* – на 52,63% ($r=0,9705$), по сравнению с контролем. Следовательно, в обоих случаях цианобактериальная обработка семян приводит к снижению концентрации ТМ в почве за счет выноса ее растением.

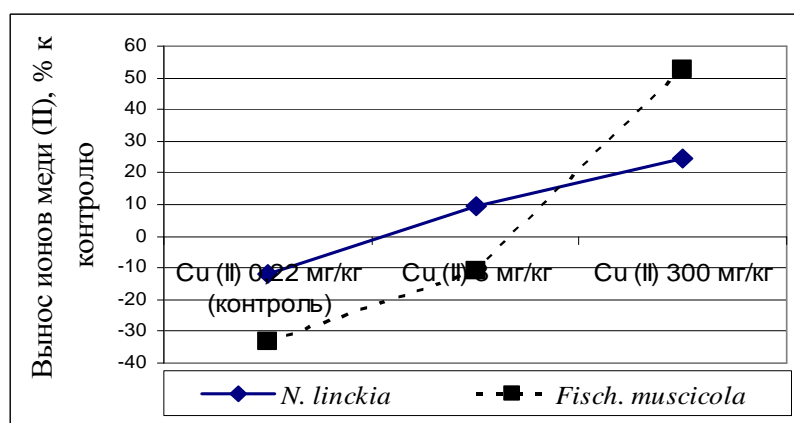


Рисунок 45. Содержание ионов меди (II) в надземной части горчицы, инокулированной ЦБ, % к контролю

Однако, исходя из бóльшей сорбционной активности *Fisch. muscicola* и меньшей пищевой ценности горчицы, именно растительно-цианобактериальный комплекс «горчица белая + *Fisch. muscicola*» можно

рекомендовать в качестве эффективного биоремедиатора почв, в которых наблюдается высокое содержание меди.

Таким образом, установлено, что содержание Cu^{2+} в семенах горчицы и пшеницы выше, чем в их вегетативной массе. В случае гороха наблюдается противоположный эффект – максимальное накопление Cu^{2+} зафиксировано в вегетативной массе. Максимальный вынос Cu^{2+} из почвы обеспечивает растительно-цианобактериальный комплекс «*Sinapis alba* + *Fisch. muscicola*» как семенами, так и вегетативной массой растения. Следовательно, можно говорить об усилении фиторемедиационных способностей горчицы белой при контакте с ЦБ *Fisch. muscicola*. Таким образом, данный растительно-цианобактериальный комплекс реально использовать для ремедиации почв, загрязненных Cu^{2+} .

ВЫВОДЫ

1. Доказано, что ионы меди и никеля физиолого-биохимические показатели функционирования альгологически чистой культуры почвенной ЦБ *N. linckia*, биопленок *N. commune* и биопленок с доминированием ЦБ р. *Phormidium*. Это проявляется в изменении дегидрогеназной и каталазной активности, снижении интенсивности биохемилюминесценции, концентрации хлорофилла *a*; возрастании концентрации феофитина и малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов. Впервые для оценки токсичности ионов меди и никеля доказана возможность использования метода количественного определения формазана в клетках ЦБ *N. linckia*. Данные методики можно использовать для создания тест-системы на присутствие ионов меди и никеля.

2. Почвенная ЦБ *N. linckia* является перспективным объектом для разработки методов цианобактериальной очистки жидкостей от ТМ благодаря высокому уровню сорбционной активности (до 60% извлечения из культуральной жидкости). Доказано, гомогенизированная суспензия культуры пленок с доминированием р. *Phormidium* (0,2 г/1дм³) при контактировании с водным раствором, содержащим 20 мг/дм³ меди, приводит к снижению содержания ионов ТМ до 99% из индивидуальных растворов и до 96 % из смеси ионов ТМ (Получен патент на изобретение № 2501745 «Способ очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди»). Показан высокий уровень биосорбции ТМ из почвенной и водной сред биопленками *N. commune*, которые представляют собой длительно вегетирующие наземные многовидовые цианобактериальные сообщества, способные к самовосстановлению после механического разрушения. Отмечена повышенная поглощательная способность гомогената по сравнению с пленкой.

3. Влияние возрастающих концентраций меди на аборигенные почвенные микробные группировки выражается в усилении доли цианобактериального компонента в структуре фототрофных популяций в почве (до 80%) и перестройке микокомплексов в сторону возрастания доли темноокрашенных

грибов и резком сокращении форм с бесцветным мицелием под посевами разных сельскохозяйственных культур.

4. Установлено, что предпосевная цианобактериальная инокуляция семян пшеницы и гороха почвенными ЦБ *N. linckia* обладает защитным действием для растений при их выращивании в медьзагрязненной почве. Предпосевная инокуляция семян горчицы белой культурой почвенной ЦБ *Fisch. muscicola* повышает уровень выноса Cu^{2+} из почвы. Поэтому растительно-цианобактериальный комплекс «*Sinapis alba* + *Fischerella muscicola*» может служить основой для создания системы мероприятий, направленных на биоремедиацию почв, загрязненных медью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ТМ – тяжелые металлы;
ЦБ – цианобактерии;
МО – микроорганизмы;
ПОЛ – перекисное окисление липидов;
МДА – малоновый диальдегид;
СОД – супероксиддисмутаза;
ГМК – горно-металлургический комбинат;
КЧХК – Кирово-Чепецкий химический комбинат;
РСО – Республика Северная Алания;
ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид;
ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия;
мВ – милливольт;
АК – активность каталазы;
рН – концентрация водородных ионов в растворе;
БХЛ – биохемилюминесценция;
Лк – люкс;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
ИПЗ – интегральный показатель загрязнения;
ПДК – предельно допустимые концентрации;
КОЕ – колониобразующая единица;
НП – нефтепродукты;
Me²⁺ – ионы металлов;
АД – автодорога;
ЖД – железная дорога;
РЭМ – растровая электронная микроскопия;
ГЦ – гетероцистные ЦБ;
БГЦ – безгетероцистные ЦБ;
ОС – окружающая среда;
r_П – коэффициент корреляции Пирсона.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Видовой состав фототрофов биопленки *Nostoc commune*

Вблизи автодороги	Вблизи железной дороги
1. <i>Nostoc commune</i>	1. <i>Nostoc commune</i>
2. <i>N. punctiforme</i>	2. <i>N. punctiforme</i>
3. <i>Tolypothrix tenuis</i>	3. <i>Phormidium autumnale</i>
4. <i>Calothrix elenkinii</i>	4. <i>Ph. molle</i>
5. <i>Microchaete tenera</i>	5. <i>Leptolyngbya fragilis</i>
6. <i>Phormidium autumnale</i>	6. <i>L. foveolarum</i>
7. <i>Ph. boryanum</i>	7. <i>Chlorella mirabilis</i>
8. <i>Ph. formosum</i>	8. <i>Phormidium uncinatum</i>
9. <i>Leptolyngbya frigida</i>	9. <i>Plectonema nostocorum</i>
10. <i>L. fragilis</i>	
11. <i>L. foveolarum</i>	
12. <i>L. angustissima</i>	
13. <i>Tychonema granulatum</i>	
14. <i>Oscillatoria sp.</i>	
15. <i>Chlorella vulgaris</i>	
16. <i>Chlamydomonas gloeogama</i>	
17. <i>Chlorococcum sp.</i>	
18. <i>Coenocystis planctonica</i>	
19. <i>Stichococcus bacillaris</i>	
20. <i>Klebsormidium flaccidum</i>	
21. <i>Kleb. rivulare</i>	
22. <i>Characiopsis minima</i>	
23. <i>Eustigmatos magnus</i>	

Таблица 2

Содержание ионов меди (II) в семенах и вегетативной массе при обработке растений цианобактерией *Fischerella muscicola*, мг/кг

Культура, вариант		Вегетативная масса	Семена	Всего	
Пшеница	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	1,9±0,4	8±1,81,6	9,9±2,2
		<i>Fischerella muscicola</i>	2,9±0,7	7,2±1,8	10,1±2,3
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	5,3±1,2	8,7±2,0	14±3,2
		<i>Fischerella muscicola</i>	8,7±2	8±1,8	16,7±3,8
Горох	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	19,37±0,13	5,20±0,00	24,57±0,13
		<i>Fischerella muscicola</i>	16,26±0,19	5,98±0,04	22,24±0,23
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	44,06±0,18	6,66±0,05	50,72±0,23
		<i>Fischerella muscicola</i>	48,00±00,00	5,45±0,07	53,45±0,07
Горчица	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	2,3±0,5	4±0,9	6,3±1,4
		<i>Fischerella muscicola</i>	2,4±0,5	3,2±0,7	5,6±1,2
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	2,7±0,6	3±0,7	5,7±1,3
		<i>Fischerella muscicola</i>	3,3±0,8	5,4±1,3	8,7±2,1

Таблица 3

Содержание ионов меди (II) в семенах и вегетативной массе при обработке растений цианобактерией *Nostoc linckia*, мг/кг

Культура, вариант		Вегетативная масса	Семена	Всего	
Пшеница	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	1,9±0,4	8±1,81,6	9,9±2,2
		<i>Nostoc linckia</i>	2,2±0,5	7,3±1,7	9,5±2,2
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	5,3±1,2	8,7±2,0	14±3,2
		<i>Nostoc linckia</i>	2,8±0,6	8,4±1,9	11,2±2,5
Горох	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	19,37±0,13	5,20±0,00	24,57±0,13
		<i>Nostoc linckia</i>	5,91±0,12	4,76±0,23	10,67±0,35
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	44,06±0,18	6,66±0,05	50,72±0,23
		<i>Nostoc linckia</i>	8,34±0,01	5,21±0,16	13,56±0,17
Горчица	Cu (II) 3 мг/кг	Без обработки	2,3±0,5	4±0,9	6,3±1,4
		<i>Nostoc linckia</i>	2,9±0,7	4±1	6,9±1,7
	Cu (II) 300 мг/кг	Без обработки	2,7±0,6	3±0,7	5,7±1,3
		<i>Nostoc linckia</i>	3,2±0,7	3,9±0,9	7,1±1,6

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян, З.А. Токсичность тяжелых металлов для МО [Текст] / З.А. Авакян // Микробиология. – М. – 1973. – Т. 2. – С. 5–46.
2. Агрэкология [Текст] / В. А. Черников, Р. М. Алексахин, А. В. Голубев и др. – М.: Колос, 2000. – С. 536.
3. Альго-микологическая оценка состояния почв в зоне влияния Кирово-Чепецкого химического комбината [Текст] / Е.В. Дабах, Л.В. Кондакова, Л.И. Домрачева, С.С. Злобин // Почвоведение. – 2013. – № 2. – С. 187–194.
4. Альго–микологические и фитотоксические комплексы при химическом загрязнении почвы [Текст] / Л.И. Домрачева, Е.В. Дабах, Л.В. Кондакова, А.И. Фокина // Экология и почвы: матер. 13 Всерос. школы. – Пушкино, 2006. – Т. 5. – С. 88–98.
5. Альго–циано–микологические комплексы городских почв // Особенности урбозкосистем подзоны южной тайги Европейского Северо–Востока [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Ю.Н. Зыкова, В.А. Ефремова под. ред. Ашихминой Т.Я., Домрачевой Л.И. – Киров: Изд–во ВятГГУ. – 2012. –С. 282.
6. Ананьева, Н.Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв [Текст] / Н.Д. Ананьева. – М.: Наука, 2003. – 223 с.
7. Андреюк, Е.И. Цианобактерии [Текст] / Е. И. Андреюк, Ж. П. Коптева, В.В. Занина. – Наукова думка, 1990. – С. 200.
8. Антонова, О.Ю. Биосорбция тяжелых металлов фототрофными МО [Текст] / О.Ю. Антонова // Биология – наука XXI века: матер. X Международ. конф. Молодых ученых. – Пушкино, 2006. – С. 356;
9. Ашихмина, Т.Я. Экологические аспекты радиационной безопасности в районе Кирово-Чепецкого химического комбината [Текст] / Т.Я. Ашихмина // Атомная энергия, общество, безопасность: матер. Второго общест-

- венного форума.– С.– Петербург, 2008. – С. 398– 403.
10. Ашихмина, Т.Я. Эколого–аналигический мониторинг антропогенных нарушенных почв [Текст] / Т.Я. Ашихмина, Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова // Вестник ВятГГУ. – 2006. – № 14. – С. 153–169.
 11. Багаева, Т.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: учеб. – метод. пособие [Текст] / Т.В. Багаева, Н.Э. Ионова, Г.В. Надеева. – Казань: Казанский университет, 2013. – 56 с.
 12. Басалаева, Л.А. Влияние химического загрязнения на синтез антоциановых пигментов растениями ячменя [Текст] / Л.А. Басалаева, С.Ю. Огородникова //Экология родного края проблемы и пути их решения: Материаллы 4-й обл. науч.-прктич. Конф. Молодежи. – Киров, 2009. – С. 117-118.
 13. Бачура, Ю.М., Влияние ионов меди на морфологические показатели *Chlorococcum hypnosporum* Starr. в культуре [Текст] / Ю.М. Бачура, О.М. Храмченкова //ИЗВЕСТИЯ. – 2012. – С. 3.
 14. Бекасова, О.Д. Аккумуляция кадмия и алюминия цианобактерией *Nostoc muscorum* [Текст] / О.Д. Бекасова, В.К. Орлеанский, В.В. Никандров // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – С. 851–859.
 15. Бекасова, О.Д. О механизме детоксикации ионов кадмия цианобактерией *Nostoc muscorum* при участии её внеклеточных полисахаридов [Текст] / О.Д. Бекасова, А.А. Бреховских, М.И. Москвина // Биофизика. – 2002. – № 3. – С. 515–523.
 16. Белясова, Н.А. Биохимия и молекулярная биология [Текст] / Н.А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2002.
 17. Бингам, Ф.Т., Токсичность металлов в сельскохозяйственных культурах [Текст] / Ф.Т. Бингам, Ф.Д. Перья, У.М. Джерелл //Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. – М.: Мир. – 1993. – С. 101–130.
 18. Биовосстановление засоленных почв цианобактериями [Текст] / Г.Х.

Кадырова, Б.А. Расулов, О.И. Джаббарова, И.М. Халилов // МО и биосфера: Тезисы Междунар. научн. конф. – Москва, 2007. –С. 49–50.

19. Биоплёнки *Nostoc commune* – особая микробная сфера [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, О.А. Пегушина, А.И. Фокина // Теор. и прикл. экология. – 2007. – № 1. – С. 15–19.

20. Биоремедиационные возможности почвенных цианобактерий (обзор) [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Л.Б. Попов, Ю.Н. Зыкова // Теор. и прикл. экол. – 2009. – № 1. – С. 8–18.

21. Богачева, А.С. Чувствительность цианобактерий к токсическому действию солей тяжёлых металлов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Санкт-Петербург. – 2011.

22. Бондар, И.О. Особенности цитохромоксидазной активности пресноводных водорослей при воздействии ионов металлов [Текст] / Бондар И.О. // Актуальные проблемы современной альгологии: матер. IV Междунар. Конф. – Киев, 2012 г. – С. 32–33.

23. Бреховских, А.А. Защитные механизмы автотрофной цианобактерии *Nostoc muscorum* от токсического воздействия ионов кадмия: автореф. ... дис. канд. биол. наук. – М., 2006. – С. 26.

24. Буракаева, А.Д. Роль МО в очистке сточных вод от тяжелых металлов [Текст] / А.Д. Буракаева, А.М. Русанов, В.П. Лантух. – методическое пособие. – М., 1999.

25. Бушковский, А.Л. Способ очистки сточных вод от никеля [Текст] / А.Л. Бушковский, Л.Н. Кармадонов, В.В. Бордунов // Научно-внедренческое предприятие «Эчтех». – 2011. – С. 7.

26. Валова, Е.Е. Влияние тяжёлых металлов на ферментативную активность почвы [Текст] / Е.Е. Валова, Ю.Б. Цыбенков, Е.В. Цыбикова // Учёные записки ЗабГГПУ: Экология. – 2012. – №1. – С. 63–66.

27. Васильева, С. Г. Накопление V, Li и Co клетками цианобактерии рода *Spirulina*: автореф. дис.... канд. биол. наук. – М., 2012.

28. Влияние выбросов нефтехимических производств на структуру микроскопических грибов почв и сопутствующих сред [Текст] / Н.А. Киреева, В.В. Водопьянов, А.С. Григориади, И.П. Климова // Проблемы лесной фитопатологии и микологии: матер. VII междунар. Конф. – Пермь, 2009. – С. 83–87.
29. Влияние ионов никеля и меди на состав почвенных экзометаболитов почвенных цианобактерий [Текст] / А.И. Фокина, О.Н. Гребёнкина, Е.А. Горностаева, М.С. Макарова // Биодиагностика состояния природных и природно–техногенных систем: матер. X Всероссийской научно–практической конференции с международным участием. – Киров, 2012. – С. 212–215.
30. Влияние наночастиц серебра на параметры флуоресценции хлорофилла диких и мутантных штаммов микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang [Текст] / Б.К. Заядан, Д.Н. Маторин, А.А.Усербаева, А.К. Садвакасова / IV Международная конференция «Актуальные проблемы современной альгологии: матер. конф. – Киев, 2012. – С. 115–116.
31. Влияние способов обработки семян лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) на всхожесть и интенсивность образования клубеньков [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Трефилова, А.Л. Ковина, Е.А. Горностаева, О.Н. Малыгина, Н.В. Новокшонова // Теоретическая и прикладная экология, 2014. – № 3. – С. 67-72.
32. Влияние тяжелых металлов на активность процессов азотфиксации и денитрификации несерной пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas palustris* [Текст] / В.В. Галямина, Д.В. Мольков, О.Ю. Антонова, Н.П. Ковалевская // Актуальные проблемы биологии и экологии: Матер. XIV Всерос. Молодеж. Научной конф. – Сыктывкар, 2007. – С. 49–53.
33. Волошко, Л.Н. Чувствительность *Synechocystis aquatilis* Sauv. к ионам цинка [Текст] / Л.Н. Волошко, О.В. Гаврилова, // Альгология. – 1992 – Т.2. – №1 – С. 77–80.

34. Выдра, Ф. Инверсионная вольтамперометрия [Текст] / Ф. Выдра, К. Штулик, Эю Юлакона. – М.: Мир, 1980. – С. 272.
35. Гайсина, Л. А. [Текст] / Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. ББК 28.591 Г 14. – 2008.
36. Гапочка, Л.Д. Об адаптации водорослей [Текст] / Л.Д. Гапочка – М.: Изд-во МГУ, 1981. – С. 79.
37. Гапочка, Л.Д. Популяционные аспекты устойчивости цианобактерий и микроводорослей к токсическому фактору: автореф. дис. ... доктора биологических наук в форме научного доклада, – Москва. – 1999.
38. Гаранин, Р.А. Метод биосорбции тяжелых металлов из промышленных сточных вод с использованием пивоваренных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: автореф. дис. ... канд. Биол. наук, – Москва – 2011.
39. Глазовская, М.А. География почв с основами почвоведения [Текст] / М.А. Глазовская, А.Н. Геннадиев. – М.: МГУ. – 1995.
40. Глутатион [Текст] // Большая советская энциклопедия: в 30 т. / гл. ред. А. М. Прохоров. – 3-е изд. – М. : Советская энциклопедия, 1969–1978.
41. Голлербах, М.М. Почвенные водоросли [Текст] / М.М. Голлербах, Э.А. Штина. – Л.: Наука, 1969. – С. 228.
42. Голлербах, М.М. Синезелёные водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. [Текст] / М.М. Голлербах, Е.К. Косинская, В.Н. Полянский – М.: Сов. наука, 1953. – С. 652 .
43. Горностаева, Е.А. Действие техногенного загрязнения на микробные группировки почв химически загрязненных территорий [Текст] / Е.А. Горностаева, А.И. Фокина, С.С. Злобин // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем. Книга 2.: матер. X Всерос. научно-практ. конф. с междунар. Уч. – Киров, 4–5 декабря 2012. – С. 150–154.
44. ГОСТ 17.4.3.06–86. Охрана почв. Почвы. Общие требования к классификации почв по влиянию на них химических загрязняющих веществ.

45. ГОСТ Р 17.4.3.07–2001. Охрана природы. Почвы. Требования к свойствам осадков сточных вод при использовании их в качестве удобрений.
46. Гришенкова, Н.Н. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода [Текст] / Н.Н. Гришенкова, А.С. Лукаткин // Поволжский экологический журнал. – и 2005. – № 1. – С. 3–11.
47. Громов, Б.В. Цианобактерии в биосфере [Текст] / Б.В. Громов // Соросовский образовательный журнал, – 1996. – Т. 9. – С. 33–39.
48. Грубинко, В.В. Особенности адаптации одноклеточных пресноводных водорослей к тяжелым металлам [Текст] / В.В. Грубинко // IV Международная конференция «Актуальные проблемы современной альгологии»: тезисы докладов. Киев, 23–25 мая 2012. – С.83–85
49. Гузев, В.С. Техногенные изменения сообщества почвенных МО [Текст] / В.С. Гузев, С.В. Левин //Перспективы развития почвенной микробиологии/ред. ДГ Звягинцев. М. – 2001. – С. 178– 219.
50. Гусев, М.В., Микробиология [Текст] /М.В. Гусев, Л.А. Минеева – Москва: Изд-во ..., 2003. – С.
51. Давыдова, С.Л. О токсичности ионов металлов / С.Л. Давыдова. – М.: Знание, 1991. – 32 с.
52. Дмитриева, А.Г. Влияние ионов металлических руд и концентратов на рост и развитие *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenk. в культуре [Текст] / А.Г. Дмитриева // «Цветение» воды. Вып.2. – Киев: Наукова думка, 1969. – С. 207–215.
53. Добровольский, В.В. География почв с основами почвоведения [Текст] / В.В. Добровольский. – М.: Владос, 2001.
54. Домрачева, Л. И. Биоплёнки *Nostoc commune* – особая микробная сфера [Текст] / Л. И. Домрачева, Л. В. Кондакова, О. А. Пегушина, А. И. Фокина // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 1. – С. 15–19.
55. Домрачева, Л. Фузарии: биологический контроль, сорбционные воз-

- возможности [Текст] / Л. Домрачева, Л. Трефилова, А. Фокина. – Германия: Изд-во LAP LAMBERT Academic Publishing, – 2013а. – С. 181.
56. Домрачева, Л.И. «Цветение» пахотных почв [Текст] / Л.И. Домрачева // Аграрная наука Северо-востока европейской части России на рубеже тысячелетий: состояние и перспективы. – Киров. – 2000. – Т. 2. – С. 28–39.
57. Домрачева, Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития [Текст] / Л.И. Домрачева – Сыктывкар, 2005. – С. 336.
58. Домрачева, Л.И. «Цветение» почвы: специфика в агро- и урбоэкосистемах [Текст] // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах: Материалы Междунар. научно-практ. конф., посвящённой 100-летию со дня рождения проф. Э.А. Штиной. – Киров: Вятская ГСХА, 2010. – С. 99–107.
59. Домрачева, Л.И. Биомониторинг и биотестирование почв [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, А.И. Фокина и др. // Биоиндикаторы и биотест-системы в оценке окружающей среды техногенных территорий: матер. Конф. – Киров, 2008. – С. 68–105.
60. Домрачева, Л.И. Биопленки *Nostoc commune* – особая микробная сфера [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – №1. – С.15–19.
61. Домрачева, Л.И. Использование микромицетов для индикации состояния почвы [Текст] / Л.И. Домрачева // Биологический мониторинг природно-техногенных систем. – Сыктывкар, 2011. – С. 111-113.
62. Домрачева, Л.И. Мобилизация альгорезервов при антропогенном загрязнении почвы [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова // Альгологические исследования: современное состояние и перспективы на будущее: Матер. I Всерос. Науч. – практ. Конф. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2006. – С.128.
63. Домрачева, Л.И. Поллютанты как пусковой механизм сукцессий альгоценозов (модельные опыты) [Текст] / Л.И. Домрачева, Ю.Н. Зыкова, Л.В.

- Кондакова // Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – №3. – С.23–27.
64. Домрачева, Л.И. Структура группировок водорослей при «цветении» почвы [Текст] / Л.И. Домрачева, Э.А. Штина // Ботанический журнал. – 1985. – Т. 70. – № 2. – С. 180–187.
65. Домрачева, Л.И. Цианобактерии городских почв [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Ю.Н. Зыкова, В.А. Ефремова // Принципы экологии. – 2013. – Т.2. – №4. – С.10–27.
66. Дорохова, М.Ф. Водоросли как индикаторы загрязнения почвы компонентами ракетного топлива [Текст] / М.Ф. Дорохова // Актуальные проблемы современной альгологии: матер. IV Междунар. Конф. – Киев, 2012. – С.
67. Дубовик, И.Е. Водоросли эродированных почв и альгологическая оценка почвозащитных мероприятий [Текст] / Дубовик И.Е. – Уфа. 1995.
68. Дурнев, Е.А. Электронная микроскопия: Методические указания к лабораторным работам [Текст] / Е. А. Дурнев. Киров.: Изд-во ВятГУ, 2011. – 13 с.
69. Евдокимова, Г. А. Очищение почв и сточных вод от нефтепродуктов комбинированными методами в условиях севера [Текст] / Г. А. Евдокимова и др. // Вестник Кольского научного центра РАН. – 2010. – №. 3. – С. 17–24.
70. Евдокимова, Г.А. Биологическая активность почв в условиях аэротехногенного загрязнения на Крайнем Севере [Текст] / Г.А. Евдокимова, Н.П. Мозгова. – Наука, 1984. – с.
71. Евдокимова, Г.А. Микробиологические процессы в системе добычи и переработки апатит–нефелиновых руд с использованием оборотного водоснабжения [Текст] / Евдокимова Г.А., Гершенков А.Ш., Воронина Н.В. – СПб.: Наука, 2008.
72. Евдокимова, Г.А. Эколого–микробиологические основы охраны почв

Крайнего Севера [Текст] / Г. А. Евдокимова – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН. – 1995. – С. 272.

73. Ерохина, Н.И. Экологическая оценка ила сточных вод и возможность его использования в биоремедиации нефтезагрязненных почв: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2012.

74. Ефремова, Н. Разработка способов получения антиоксидантов препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей: автореф. Дис. ... докт. биол. наук. – Кишинев, 2009.

75. Жуйкова, Л. И. Обработка сточных вод путем использования биополимеров активного ила: автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Щелково, 2007 – С. 29.

76. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию [Текст] / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова – М.: Книжный дом «Университет», 2001. – 98 с.

77. Заварзин, Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии [Текст] / Г.А. Заварзин – М.: Наука, 2003. – 348 с.

78. Закирова, З.Р. Синезеленые водоросли (цианобактерии) антропогенно нарушенных почв и их консортивные связи: автореф. дис. ... канд. биол. наук: Уфа, 2006.

79. Зангелиди, В.В. Влияние техногенного загрязнения на состояние почв г. Владикавказа: автореф. дис. ... канд. геогр. наук.: Владикавказ, 2009.

80. Зарипова, Л.Х. Биология и экология почвенной цианобактерии *Cylindrospermum michailovskoense* (CYANOPROKARYOTA): автореф. Дис. ... канд. биол. наук: Уфа. – 2009.

81. Звягинцев, А.Г. Биология почв Изд. 3-е, испр. и доп. [Текст] / А.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова – М.: Издательство Московского университета, 2005. – 448 с.

82. Зыкова, Ю.Н. Комплексы водорослей, цианобактерий и гри-

- бов городских почв и их реакции на действие поллютантов: автореф. ... дис. канд. биол. наук. – Москва, 2013. – 30 с.
83. Изучение состояния почв на территории вблизи Кирово–Чепецкого химического комбината [Текст] / С.Г. Скугорева, Е.В. Дабах, Т.А. Адамович, Г.Я. Кантор, И.И. Шуктомова, Т.Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. – №2. – 2009. – С.37–46.
84. Изучение воздействия фосфорсодержащих поллютантов на почвенные МО [Текст] / Т.Я. Ашихмина и др. // Российский химический. – 2010. – С. 183.
85. Ильин, В.Б. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах и растениях Новосибирской области [Текст] / В.Б. Ильин, А.И. Сысо. – Новосибирск: Изд–во СО РАН, 2001.
86. Использование биологических тестов при оценке загрязнения почв и сельскохозяйственной продукции свинцом [Текст] / В.И. Савич и др. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2003. – №. 1. – С. 18.
87. Кабиров, Р.Р. Почвенные водоросли техногенных ландшафтов: дис. ...доктора биол. Наук. Уфа, 1991. – С. 345.
88. Кабиров, Р.Р. Использование универсальных критериев при оценке экологического состояния почвенных альгоценозов [Текст] / Р.Р. Кабиров, Л.А. Гайсина, Л.М. Сафиуллина // Экология. –2010. – №4. – С.226–270.
89. Карпова, Е.А. Эколого-агрехимические аспекты длительного применения удобрений: состояние тяжелых металлов в агроэкосистемах: автореф дис. ... докт. биол. наук. – Москва, 2006.
90. Киреева, Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах [Текст] / Н.А. Киреева. – Уфа: БашГУ, 1994. – 172 с.
91. Комплексная оценка состояния цианобактерии *Nostoc paludosum* Kütz при воздействии различных поллютантов [Текст] / С.Ю. Огородникова, Ю.Н. Зыкова, Г. И. Березин, Л.И. Домрачева, А.А. Калинин // Теоретиче-

ская и прикладная экология. – 2010. – №3. – С. 47–51.

92. Комплексная оценка эффективности ремедиации нефтезагрязнённых почв интродуцированным цианобактериальным сообществом [Текст] / М.В.Горленко, О.Б. Сопрунова., О.И. Шадрина, А.С. Терехов // Вестн. Моск. ун-та. – Сер. 17. – 2006. – №1. – С. 38–44.

93. Конышева, Е.Н. Влияние тяжёлых металлов и ихдетоксикантов на ферментативную активность почвы [Текст] / Е.Н. Конышева, И.С. Коротченко // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2011. – №1. – С.114–119.

94. Корельский, Д. С. Оценка уровня загрязнения приповерхностного слоя почв в зоне воздействия металлургического предприятия [Текст] / Д.С. Корельский // Горный информационно–аналитический бюллетень – М.: МГГУ, № 9, 2008. – С. 330 – 333.

95. Костина, Л.В. Изучение устойчивости актинобактерий к солям ванадия [Текст] / Л.В. Костина, М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // Вестник Перм. ун-та. – 2004. – № 2. С. 114–117.

96. Костяев, В.Я. Реакция цианобактерий на некоторые тяжелые металлы [Текст] / В.Я. Костяев // Микробиология. – 1980. – Т. 49. – №. 5. – С. 821–824.

97. Кудряшёва, Н.С. Физико–химические основы биолюминесцентного анализа [Текст] / Н.С. Кудряшёва, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова // Красноярск: Красноярский университет. – 2002. – 154с.

98. Кудряшева, Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа [Текст] / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова // учебное пособие. – Красноярск. – 2002. – С. 154.

99. Кузякина, Т.И. Экология и геохимическая деятельность МО на активных вулканах и в гидротермах [Текст] / Т.И. Кузякина. – Владивосток: Дальнаука, 2004. – 251 с.

100. Куимова, Н.Г. Аккумуляция и биоминерализация благородных ме-

- таллов микромицетами [Текст] / Н.Г.Куимова, О.В. Жилин, Л.М. Павлова // Микол. и фитопатол. – 2008. –Т. 42. – № 4. – С. 342–353.
101. Лозовая, О.Г. Поиск биосорбентов тяжелых металлов среди дрожжей различных таксономических групп [Текст] / О.Г. Лозовая, Т.П. Касаткина, В.С. Подгорский // Микробиология. – 2004. –Т. 66. – № 2. – С. 92–101.
102. Лукаткин, А.С. Холодное повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс [Текст] / А. С. Лукаткин – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.
103. Лысак, Л.В. Бактериальные сообщества городских почв: Автореф. ... дис. докт. биол. наук. – М., 2010. – 46 с.
104. Лябушева, О.А. Накопление элементов клетками цианобактерий: автореф. ... дис. канд. биол. наук. – М.:МГУ, 2004. – 21 с.
105. Лялина, Е.И. Методика определения глутатиона в цианобактериях методом инверсионной вольтамперометрии [Текст]// Бизнес. Наука. Экология родного края: проблемы и пути их решения: матер. Всерос. научно-практич. конференции–выставки с междунар. – Киров: ООО «Лобань», 2013. – С.236–239.
106. Мазо, В.К. Современные проблемы физиологии пищеварения [Текст] / В.К. Мазо // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – №1. – С 47–53.
107. Марфенина, О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов [Текст] / О.Е. Марфенина // М.: Медицина для всех, – 2005. – 196 с.
108. Масленников, П.В. Антоцианы как тест на нефтяное загрязнение [Текст] / П.В. Масленников, А.В. Бородей// Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга: 11 Международный симпозиум по биоиндикаторам. – Сыктывкар, 2001. – с. 124–125, с. 313–313.
109. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв и грунтов флуориметрическим методом с использованием анализатора жидкости «Флюорат–024» ПНДФ 16.1:2.21–98. – М.: 1998

110. Методика выполнения измерений массовых долей токсичных металлов в пробах почв атомно–абсорбционным методом. ФР.1.31.2007.04106 [Текст]. – М. – 13 с.
111. Методические подходы к количественному определению формазана в клетках цианобактерий [Текст] / С.Ю. Огородникова, Л.И. Домрачева., Е.А. Горностаева, А.И. Фокина // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: материалы XI Всерос. научно-практич. конференции-выставки инновационных экологических проектов с международ. участием. – Киров: Изд-во ООО «ВЕСИ», 2013. – С. 48-51.
112. Методические указания по определению тяжёлых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. М.:ЦИНАО, 1992. – 40 с.
113. Методология изучения влияния ионов тяжёлых металлов на культуры почвенных цианобактерий [Текст] / А. И. Фокина, Ю. Н. Зыкова, Д. Н. Данилов, Т. Я. Ашихмина, М.С. Жмак // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 21–27.
114. Микробиологические и биохимические показатели загрязнения свинцом дерново–подзолистой почвы [Текст] / Д.Г. Звягинцев, А.В. Кураков, М.М. Умаров, З. Филипп // Почвоведение. –1997. – № 9. –С. 1124–1131.
115. Микробная детоксикация тяжёлых металлов (обзор) [Текст] / А.И. Фокина, Л.И. Домрачева, И.Г. Широких, Л.В. Кондакова, С.Ю. Огородникова // Теор. и прикл. экол. – 2008. – № 1. – С. 4–11.
116. Мишустин, Е.Н. Ассоциация почвенные МО [Текст] / Е.Н. Мишустин. – М.: Наука, 1975. – 106 с.
117. Муравьева, Д.А. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов цветках василька синего [Текст] / Д.А. Муравьева, В.Н. Бубенчикова, В.В. Беликов // Фармакология. – 1987. – Т.36. – С.28–29.
118. Мушак, П.О. Абсорбція іонів важких металів синьозеленою

- водорістю *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl [Текст] / П.О. Мушак // Украин. Ботан. Журн. – 2006. – т.63. – №4 – С. 551–557.
119. Николаев, В.Г. Гемосорбция на активированных углях [Текст] / В.Г. Николаев, В.В. Стрелко // Киев: Наукова думка. – 1979. – С. 285.
120. Николаев, Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды [Текст] / Ю.А. Николаев // Прикл. биохимия и микробиол. – 2004. – Т.40. – №4. – С. 387–397.
121. Опыт многостороннего исследования функциональных возможностей почвенных цианобактерий [Текст] / А.И. Фокина, М.С. Жмак, О.Н. Гребёнкина, Е.А. Горностаева, С.Ю. Огородникова // Адаптационные реакции живых систем на стрессорные воздействия: матер. Всерос. Молодёжн. Конф. – Киров, 2012. – С. 106–111.
122. Особенности накопления ионов никеля (II) и меди (II) в различных фракциях клеток цианобактерии *Nostoc linckia* [Текст] / Е.И. Лялина, Е.А. Горностаева, К.О. Черезова, Е.О. Кузнецова, А.И. Фокина // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции-выставки инновационных экологических проектов с международным участием. – Киров: Изд-во ООО «ВЕСИ», 2013. – С. 58-63.
123. Официальный портал Республики Северная Осетия–Алания. – [Электронный ресурс]. URL: <http://www.rso-a.ru/about/detail.php?ID=1662> (дата обращения: 17.12.2013).
124. Оценка экотоксикологического потенциала почв, загрязнённых тяжёлыми металлами, по степени развития различных групп МО [Текст] / Е. А. Горностаева, Д. А. Мельков, З. В. Кабалоев, С.С. Злобин, Г.И. Березин // Биологический мониторинг природно–техногенных систем: матер. Всерос. научно–практ. конф. с междунар. Уч. – Киров, 29–30 ноября 2011. – 182–185 с.
125. Панкратова, Е.М. Почвенные Цианобактерии в прошлом Земли, их

экологическая роль в настоящем и возможная – в будущем [Текст] / Е.М. Панкратова // Экология почвы: изб. лекции X Всерос. школы. – Пущино, 2001. – Т. 4. – С. 39-78.

126. Панкратова, Е.М. Становление функциональных особенностей цианобактерий на путях их сопряженной эволюции с биосферой [Текст] / Е.М. Панкратова // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – №3. – С. 4-11.

127. Патова, Е.Н. Аккумуляция металлов почвенной азотфиксирующей водорослью *Nostoc commune* в условиях Восточно–Европейских тундр [Текст] / Е.Н. Патова, М.Д. Сивков, М.В. Гецен // Альгология. – 2000. – Т. 10. – № 3. – С. 250–256.

128. Пестова, Е.Л. Влияние салициловой кислоты на состояние перекисного гомеостаза растений гороха при преадаптации к тепловому шоку: автореф. дис. ... кандидата биологических наук, – Нижний Новгород. – 2007.

129. Плеханов, С.Е. Биотестирование цинка, кадмия, кобальта по физиологическим реакциям клеток харовых водорослей [Текст] / С.Е. Плеханов, И.М. Аль–Сальман, М.М. Телитченко // Водная токсикология и радиоэкология. – 1990. – Т. 26. – № 5. – С. 42–46.

130. Последствие действия бихромата калия на культуру *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Wreb. (Chlorophyta) при изменениях токсической нагрузки [Текст] / В.И. Артюхова, А.Г. Дмитриева, О.Ф. Филенко, Чжао Ицзюнь // Альгология. – 1996. – Т.6. – №2. – С.142–149

131. Практикум по микробиологии [Текст] / Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

132. Применение тетразольно–топографического метода определения гидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Т.Я. Ашихмина, С.Ю. Огородникова, А.С. Олькова, А.И. Фокина // Теор. и прикл. экология. – 2008. – №2. – С. 23–28.

133. Природные ресурсы Республики Северная Осетия-Алания: В 18–ти т. [Текст] / Отв. Ред. В.С. Вагин. – Владикавказ: Проект – Прогресс. – 2000. – С. 384.
134. Раилкин, А.И. Самосборка сообщества морского микрообрастания [Текст] / А.И. Раилкин // ДАН. – 1994. – Т. 337. – № 1. – С. 140–140.
135. Реакция различных видов цианобактерий рода *Nostoc* на действие токсикантов [Текст] / С.Ю. Огородникова, Ю.Н. Зыкова, Г.И. Березин, Л.И. Домрачева, А.А. Калинин // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах: Матер. Междунар. научно–практич. Конф., посвящ. 100–летию со дня рождения проф. Э.А. Штиной. – Киров., 2010. – С. 216–221.
136. Росинский, А.П. Газовая хромато–масс–спектрометрия [Текст] / А.П. Росинский, А.А. Алалыкин – методические указания. – Киров.: Изд–во ВятГУ, 2011. – 37 с.
137. Ростам, Ш. Влияние высоких концентраций CuSO_4 на дыхание *Dinialiella viridis* Teodor [Текст] / Ш. Ростам, В.А. Малеев // Актуальные проблемы современной альгологии: материалы IV Международной конференции. – Киев, 2012г. – С. 54–62.
138. Руководство по эксплуатации биохемилюминометра БХЛ–07. – Нижний Новгород. – 2007. – 35с.
139. Саванина, Я.В. Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей [Текст] / Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, Е.Л. Барский // Вестн. Моск. ун–та. Сер. Биология. – 2003. – №. 3. – С. 29–37.
140. Саванина, Я.В. Способность цианобактерий и микроводорослей к накоплению тяжелых металлов и возможность их использования для очистки водной среды [Текст] / Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, М.В. Гусев // Вест. Моск. Ун. – 1999. – Т. 16. – С. 3–12.
141. Савельев, И.Б. Влияние ионов цинка на морфологию и ультраструк-

туру клеток цианобактерий [Текст] / И.Б. Савельев, И.О. Селях // Авто-трофные МО: материалы междунар. научн. конф. – М.: МАКС Пресс. 2000. – С. 159–160.

142. Сайт международной экономической статистики [Электронный ре-сурс] // URL: <http://www.statinfo.biz/html/M1502F4649A64L1.aspx> (дата об-ращения: 19.11.2013).

143. Сакевич, А.И. Экзометаболиты пресноводных водорослей [Текст] / Сакевич А.И. – Киев: Наукова думка, 1985. – 199 с.

144. Самохвалова, В.Л. Тяжелые металлы как фактор техногенного воз-действия на почвенные микроорганизмы [Текст] / В.Л. Самохвалова, А.И. Фатеев // Грунтознавство. – 2006. – Т.7. – № 1–2. – С. 88–95.

145. Сборник методик измерений массовой концентрации ионов меди, свинца, кадмия, цинка, висмута, марганца, никеля и кобальта методом вольтамперометрии на вольтамперометрическом анализаторе «Экотест–ВА». – М.: ООО «Эконикс–Эксперт», 2004. – 61 с.

146. Связывание ионов меди грибными меланинами [Текст] / Н.М. Ров-бель, И.А. Гончарова, А.Э. Томсон, В.Г. Бабицкая, С.В. Пармон // Микро-биология и биотехнология на рубеже 21 столетия: матер. международной конф. – Минск, 2000. – С. 79–80.

147. Сервер администрации г. Владикавказ [Электронный ресурс] // URL: <http://www.vladikavkaz-osetia.ru/city/> (дата обращения: 19.11.2013).

148. Сиренко, Л.А. Биологически активные вещества водорослей и качест-во воды [Текст] / Л.А. Сиренко, В.Н. Козицкая. – Киев: Наукова думка, 1988. – С. 256.

149. Скворцова, И.Н. Зависимость некоторых показателей биологиче-ской активности почв от уровня концентрации тяжелых металлов [Текст] / И.Н. Скворцова, С.К. Ли, И.П. Ворожейкина // Тяжелые металлы в ок-ружающей среде: матер. конф. – М.: МГУ, 1980. – 121с.

150. Скугорева, С.Г. Содержание ртути в компонентах природной среды

на территории вблизи Кирово–Чепецкого химического комбината [Текст] / С. Г. Скугорева, Т. Я. Ашихмина // Известия Коми Научного Центра Уро Ран. – 2012. – №. 11.

151. Смирнова, Г.В. Роль глутатиона и других антиоксидантных систем при стрессах у *Escherichia coli* : автореф. дис. ... доктора биол. наук. Пермь, –2005.

152. Содержание тяжёлых металлов и групповой состав фототрофов в природных биоплёнках *Nostoc commune* как отклик на особенности местообитания [Текст] / Е.А. Горностаева, А.И. Фокина, Л.В. Кондакова, С.С.Злобин, Г.И.Березин // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – №4. – С.167–168.

153. Сокаев, К.Е. Эколого-агрехимическая оценка почв предгорий центрального Кавказа при их длительном сельскохозяйственном использовании и применений удобрений: автореф. Дис. ... канд. Биол. наук.– Владикавказ, 2010.

154. Соколов, М.С. Здоровая почва как необходимое условие жизни человека [Текст] / М.С. Соколов, Ю.Л. Дородных, А.И. Марченко // Почвоведение. – 2010. – № 77. – С. 858–866.

155. Сопрунова, О.Б. Функционирование цианобактериальных сообществ в условиях техногенных экосистем [Текст] / О.Б. Сопрунова // Вестн. МГУ. – Сер. 16. – 2006. – № 2. – С. 24–29.

156. Спиркина, Н.Е. Использование хлорококковой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korschikov) Hindak в биотестировании [Текст] / Н.Е. Спиркина // Актуальные проблемы современной альгологии: материалы IV Международной конференции. – Киев, 2012г. – С.

157. Тарчевский, В.И. Сигнальные системы клеток растений [Текст] / В.И. Тарчевский // отв. редактор А.Н. Гречкин– М.: Наука, 2002. – 294 с.

158. Темралеева, А.Д. Оценка воздействия различных соединений свинца на сообщества водорослей серой лесной почвы: многоуровневый подход

[Текст] / А.Д. Темралеева, Д.Л. Пинский // Актуальные проблемы современной альгологии: материалы IV Международной конференции. – Киев, 2012г. – С.294–297.

159. Темралеева, А.Д. Структурные и морфологические изменения альгоцианобактериальных сообществ серой лесной почвы при загрязнении ацетатом свинца [Текст] / А.Д. Темралеева, Д.Л. Пинский, Е.Н. Патова // Водоросли: таксономия, экология, использование в мониторинге: матер. конф. – Екатеринбург, 2011. –С. 327–331.

160. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии [Текст] / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева . – М.: Дрофа. – 2004. – С. 256.

161. Терехова, В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем [Текст] / В. А. Терехова. – Москва : Наука. – 2007. – С.

162. Теромофильные цианобактерии (синезелёные водоросли) – перспективный источник нетрадиционного сырья [Текст] / В.К. Орлеанский, Л.М. Герасименко, О.С. Миходюк, В.Н. Зеленков // Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов: Матер. 3-й Рос. научно–практич.конф. – М., 2005. – С. 20–22.

163. Ткаченко, Ф.П. Влияние тяжелых металлов (Cd, Cu, Hg) на морфофизиологические показатели у зеленых водорослей *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek и *Platymonas arnoldii* (Proch. – Lavr.) Matv. [Текст] / Ф.П. Ткаченко, Е. В. Кирсанова // I съезд гидробиологов Молдавии: Тез. докл. – Кишинев, 1986. – С. 97–99

164. Тяжелые металлы как фактор антропогенного воздействия на почвенную микробиоту [Текст] / С.В. Левин, В.С. Гузев, И. В. Асеева, И.П. Бабьева, О.Е. Марфенина, М.Н. Умаров. – МО и охрана почв. М.: Изд–во МГУ. – 1989. – С. 5–14

165. Узварова, Н.А. В поиске МО, устойчивых к действию свинца [Текст] / Узварова Н.А., Вараксина А.И. //Актуальные проблемы регионального

экологического мониторинга: матер. Всеросс. научн. и образоват. научн. школы. – Киров, 2005. – С. 77–78.

166. Устойчивость низших растений к действию тяжелых металлов [Текст] / И.М. Рублева, О.А. Жарова, А.Э. Светлова, А.И. Ульданова // Эколого–биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия: материалы 5 Всероссийской научной конференции. – Астрахань, 2002. – С.165–167.

167. Федорова, В.Н. Л.А. Краткий курс медицинской и биологической физики с элементами реабилитологии [Текст]/ В.Н. Федорова, Степанова Лекции и семинары: учебное пособие. – М.:ФИЗМАТЛИТ. –2005. – С. 624.

168. Физиолого–биохимический отклик и функциональные возможности почвенных цианобактерий в условиях химического стресса [Текст] / М.С. Жмак, О.Н. Гребёнкина, Е.А. Горностаева, С.Ю. Огородникова // II Всероссийская конференция студентов, аспирантов, молодых учёных: «Экология и природопользование: прикладные аспекты»: матер. Конф. – Уфа, 2012. – С. 84–87.

169. Флуоресцентные методы оценки состояния фитопланктона в Черном море [Текст] / С.И. Погосян, Д.Н. Маторин, Э.В. Волкова и др. /Мультидисциплинарный инвестиционный оф тхе Нортхеаст парт оф тхе Бласк Сэа. – 2002. – С. 436

170. Фокина, А.И. Влияние свинца на структуру фототрофных микробных комплексов почвы: автореф. ... дис. канд. биол. наук. – Сыктывкар, 2008. – 23 с.

171. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии [Текст] / Ф. Х. Хазиев. – М.: Наука, 2005. – 252 с.

172. Хасанова, Л.А. Электрофизический анализ и физиолого–биохимические особенности клеточных повреждений ионами тяжелых металлов: автореф. дис. ... доктора биологических наук. – Уфа, 1996.

173. Хрулева, Ж.В. Очистка сточных вод промышленных предприятий от

- тяжелых металлов [Текст] / Ж.В. Хрулева, С.А. Куценко // Промышленная экология: материалы научно-технич. интернет-конференции. – 2010.
174. Чубуков, В.Ф. Микробы запасают металлы [Текст] / В.Ф. Чубуков // Химия и Жизнь. – 1982. – №11. – С. 53–55.
175. Чурикова, В.В. Основы микробиологии и вирусологии [Текст] / В.В. Чурикова, Д.П. Викторов – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1994. – С.
176. Шабаев, В.П. Применение смешанных бактериальных культур для повышения урожайности бобовых растений [Текст] / В.П. Шабаев // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - № 4. – С. 90-95.
177. Шабаев, В.П. Почвенно-микробиологические аспекты ремедиации загрязненной свинцом почвы [Текст] / В.П. Шабаев // Почвоведение и смежные науки: методы и подходы; результаты и проблемы взаимодействия по вопросам экологии: матер. XIX Всерос. школы. – Пущино, 2014. – С. 47–48.
178. Шадрина, О.И. Циано–бактериальные сообщества в практике рекультивации техногенных экосистем [Текст] / О.И. Шадрина // Тез докл. 8 съезда Гидробиол. о-ва РАН. Т.3. – Калининград, 2001. – С. 89–90.
179. Шелепаев, О.Ф. Биотехнологический потенциал фототрофных несерных пурпурных бактерий при очистке воды от поливалентных металлов [Текст] / О.Ф.Шелепаев, Н.П. Ковалевская // Актуальные проблемы биологии и экологии: матер. XVIII Всерос. молодежн. научн. конф. – Сыктывкар, 2013. – С.
180. Школьник, М.Я. Микроэлементы в жизни растений [Текст] / М. Я. Школьник – Ленинград: Наука, 1974. – 151 с.
181. Шнюкова, Е.И. Аккумуляция ионов металлов экзополисахаридами *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flach. (Cyanjphyta) [Текст] / Е.И. Шнюкова // Альгология. – 2005– Т.15. – №2. – С. 172–180.
182. Штина, Э.А. Водоросли как экологические индикаторы [Текст] / Э.А. Штина // Водная токсикология и радиоэкология. – 1990. – Т. 26. – № 5. – С.

93–96.

183. Штина, Э.А. Микроскопические водоросли как индикаторы загрязнения почвы токсическими веществами [Текст] / Э.А. Штина //Тр. ВНИИСХ Микробиологии. – Л. – 1987. – С. 45-46.

184. Штина, Э.А. Особенности почвенной альгофлоры в условиях техногенного загрязнения [Текст] / Э.А. Штина, Л.Б. Неганова, Т.А. Ельшина, И.И. Шилова, М.Ф. Андропова //Почвоведение. – 1985. – № 10. – С. 97–106.

185. Штина, Э.А. Почвенные водоросли как индикаторы загрязнения почвы промышленными выбросами [Текст] / Э.А. Штина, М.Ф. Андропова // Бюл. Почвенного института им. В.В. Докучаева. – 1983. – Вып. 35. – С. 58-72.

186. Штина, Э.А. Реакция водорослей на загрязнение почвы тяжелыми металлами [Текст] / Э.А. Штина, Г.А. Евдокимова //Биологические проблемы Севера: тез. Докл. XXI Всесоюзн. Симп. – Якутск, 1986. – Вып. 2 . – С. 92–93.

187. Штина, Э.А. Экология почвенных водорослей [Текст] / Э.А.Штина, М.М. Голлербах – М.: Наука, 1976. – 143 с.

188. Эрлих, Х. Жизнь микробов в присутствии тяжелых металлов, мышьяка и сурьмы. // Х. Эрлих, Д. Кашнер Жизнь микробов в экстремальных условиях. – М.:Мир,1981. – с. 444–446.

189. Юрин, В.М. Основы ксенобиологии [Текст] / В.М. Юрин. – Минск: Новое знание, 2002. – 267 с.

190. Aickin R.M. Lead accumulation by *Pseudomonas fluorescens* and by *Citobacter* sp. [Текст] / R.M. Aickin, A.C.R. Dean // *Microbios Lett.* 1979. – Vol. 9. – P. 55–56.

191. Al-Schadwani, M.F. Growth and heavy metal removal of *Klebsiella aerogenes* at different pH and temperature [Текст] / M.F. Al-Schadwani, S.F. Jazrawi, E.H. Al-Rawi, N.S. Ayar // *J. Environ. Sei. and Health.* 1984. – V. 19. – P. 445–457.

192. Antal, E.E. Environmental Liquid Effluents [Текст] / E.E. Antal // A Novel Approach For Treatment Of Industrial Waste Water. – 2012. – P.115–125.
193. Arsenic bioremediation by *Penicillium canescens* [Текст] / K. Vahabi, S. Karimi, S. Khodadadi, H. Ahmadi // Plant Pathol. – 2008. –V. 90. – № 3. –P. 603–604.
194. Avery, S.V. Biosorption trybutyltin and other organotin compounds in cyanobacteria and microalgal [Текст] / S.V. Avery, G.A. Codd, G.M. Cadd // Appl. Microbiol. Biotechnol. –1993. – V.39. – P. 812–817.
195. Bergman, B. N₂ Fixation by non—heterocystous cyanobacterial [Текст] / B. Bergman et al. // FEMS Microbiology reviews. – 1997. – T.19. – №3 – P. 139–185.
196. Bhattachacharya, K. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage [Текст] / K. Bhattachacharya, S. Raha // Mycopathologia. – 2002. – T. 155. – №. 3. – P. 135–141.
197. Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH Value and cell activity [Текст] /M. Vogel, A. Rossenberg, B. Li, G. Bernhard, J. Raff // Sci. Total Environ. – 2010. – Vol. – 409. – № 2. – P. 384–395.
198. Biosorption of chromium from aqueous solution and electroplating wastewater using mixture of *Candida lipolytica* and dewatered sewage sludge [Текст] / J. Ye, Bixian Mai, Hui Peng, Huaming Qin, Baoyan He, Na Zhang // Bioresource Technology. – June 2010. – Vol. 101. – Issue 11. – P. 3893–3902.
199. Biosorption of heavy metals by *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger* [Текст] /S. Bhattacharya, Tapan K. Pal, A. Basumagumdear, A.K. Banik // J. Indian Chem. Soc. – 2002. – Vol.79– № 9. – P.747–750.
200. Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal–impacted soil [Текст] / V. Andreoni, M. Colombo, A. Colombo, A. Vecchio, C. Finoli // Ann. Microbiol. – 2003. –V. 53. – № 2. – P.135–148.
201. Cadmium biosorption by free and immobilized microorganisms cultivated

- in a liquid soil extract medium: Effects of Cd, pH and techniques of culture [Текст] / T. Lebeau, D. Bagot, K. Jezequel, B. Fabre // Sci. Total Environ. – 2002. – V. 291. – №1–3. – P. 73–83.
202. Canizares–Villanueva, R.O. Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn, and a mixture Cd–Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris* [Текст] / R.O. Canizares–Villanueva, F. Martinez–Jeronimo, F. Espinosa–Chavez // Environmental toxicology. – 2000. – T. 15. – №. 3. – P. 160–164.
203. Carr, G.M. Bacteria and algae in stream periphyton along a nutrient gradient [Текст] / G.M. Carr, A. Morin, P.A. Chambers // Freshwater biology. – 2005. – T. 50. – №. 8. – P. 1337–1350.
204. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size [Текст] / G. Neumann, Y. Veeranagouda, T.B. Karegoudar, O. Sahin, I. Mausezahl, N. Kabelitz, U. Kappelmeyer, H.J. Heipieper // Extremophiles 2005. – Vol.9. – 163–168.
205. Chakravarty R., Banerjee P. C. Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals [Текст] / R. Chakravarty, P.C. Banerjee. // Extremophiles. – 2008. – T. 12. – №. 2. – P. 279–284.
206. Choudhary, M. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis* S5 [Текст] / M. Choudhary, U.K. Jetley, M. Abash Khan, S. Zutshi, T. Fatma // Ecotoxicology and environmental safety. – 2007. – T. 66. – №. 2. – P. 204–209.
207. Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae [Текст] / E. Romera, F. González, A. Ballester, M.L. Blázquez, J.A. Muñoz // Bioresource Technology. – December 2007. – Vol. 98. – Issue 17. – P. 3344–3353.
208. Costerton, J.W. Microbial interaction in biofilms [Текст] / J.W. Costerton // Microb. Physiol. and Gene Regul.: Emerg. Princ. and Appl. – 1995. – P. 20–21.

209. Das, B.K. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization [Текст] / B. K. Das et al. //Water research. – 2009. – Т. 43. – №. 4. – P. 883–894.
210. Duong, T.T. Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms [Текст] / T.T. Duong et al.//Aquatic Toxicology. – 2008. – Т. 90. – №. 1. – P. 19–28.
211. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays [Текст] / N.M. Franklin, J. L. Stauber, S.C. Apte, R.P. Lim// Environ. Toxicol. and Chem. – 2002. –V. 21. – № 4. – P. 742–751.
212. Effect of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariaceae): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance [Текст] /E.C. Schmidt, S. Rodrigo, P.A. Horta, M. Marashin, Z.L. Bouson// Micron. – 2010. – Vol. 41. – №8. – P.919–930.
213. Feng, D. Desorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxima* [Текст] / D. Feng, C. Aldrich //Hydrometallurgy. – 2004. – Volume 73. – Issues 1–2. – P. 1–10.
214. Fogg, G.E. Extracellular products of phytoplankton photosynthesis [Текст] / G.E. Fogg, Cr. Nalewaiko, W.D. Watt // Pro. Roy. Soc. Ser. Biol. Sci. – 1965. – Vol. 162. – № 989. – P. 517–534.
215. Friedberg, J. Phosphate transport in *Micrococcus lysoducticus* / J. Friedberg // Biochem. Et Biophys. Acta. 1977. – V. 466. – P. 451–460.
216. Gross, M. All together now [Текст] / Gross M. //Chem. Brit. – 2002. – V. 38. – №9. – P. 22.
217. Hamdy, A.A. Biosorption of Heavy Metals by Marine Algae [Текст] / A.A. Hamdy // Current Microbiology. – October 2000. – Volume 41. – Issue 4. – P. 232–238.
218. Jensen, T. E. et al. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: An X-ray energy dispersive study [Текст] / T. E. Jensen, M. Baxter, J. W.Rachlin, V.

- Jani //Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological. – 1982. – T. 27. – №. 2. – P. 119–127.
219. Kosower, N.S. The glutathione status of cells [Текст] / N. S. Kosower, E. M. Kosower // International review of cytology. – 1978. – B. 54. – P. 109–160.
220. Lafon–Lafourcade, S. Souches de levures [Текст] / S. Lafon–Lafourcade // Bull. O.I.V. –1984. –V. 637. –P. 185.
221. Leland, H.V. Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements [Текст] / H.V. Leland, S.N. Luoma, J.M. Fielden //Journal Water Pollution Control Federation. – 1979. – P. 1592–1616.
222. Levit, G.S. Geophysiology of cyanobacterial biofilms and the “dissymmetry” principle [Текст] / G.S. Levit, A.A. Gorbuchina, W.E. Krumbein // Bull. Inst. ocenogr. – 1999. – P. 175–196.
223. Massaccesi, G. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata [Текст] / G. Massaccesi, M.C. Romero, A.M. Bucszinsky // Word J. Microbiol. and Biotechnol. – 2002. – V. 18. – № 9. – P. 817–820.
224. Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions [Текст] / S.V. Avery, J.M. Tobin et al.// Applied and environmental microbiology. – 1993. – T. 59. – №. 9. – C. 2851– 2856.
225. Modulation de la toxicite des metaus vis-à-vis du development des biofilms cours deau [Текст] / S. Morin, T.T. Duong, S. Boutry, M.Coste // Griptogamie.Algal. – 2006. – Vol. 29– № 3. – P.201–216.
226. Moore, B.A. Fungal bioaccumulation of copper, nickel, gold and platinum [Текст] / B.A. Moore, J.R. Duncan, J.E. Burgess // Minerals Engineering. – 2008. – Vol. 21. – Issue 1. – P. 55–60.
227. Morin, A. Empirical models predicting primary productivity from chlorophyll a and water temperature for stream periphyton and lake and ocean phytoplankton [Текст] / A. Morin, W. Lamoureux, J. Busnarda //Journal of the North

- American Benthological Society. – 1999. – P. 299–307.
228. Morphological changes in an *Acidocella* strain in response to heavy metal stress [Текст] / Chakravarty R., Manna S., Ghosh A.K., Banerjee P.C. // Res J Microbiol . – 2007. – №2. – P.742–748.
229. Nepple, B.B. Morphological changes in phototrophic bacteria induced by metalloid oxyanions [Текст] / Nepple B.B., Flynn I., Bachofen R. // Microbiol Res. – 1999. – Vol.154. – P. 191–198
230. Podgorskiĭ, V.S. Yeast – biosorbents of heavy metals [Текст] / V. S. Podgorskiĭ, T. P. Kasatkina, O. G Lozovaia //Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993). – 2003. – T. 66. – №. 1. – С. 91– 103.
231. Potential applications of blue algae [Текст] / H. Chakdar, S.D. Jadhav, D.W. Dhar, S. Pabbi // Journal of Scientific & Industrial Research. – 2012. – Vol. 71. – P. 13-20.
232. Quintelas, C. Lead (II) and iron (III) removal from aqueous solution: Biosorption by a bacterial biofilms supported on granular activated carbon [Текст] /C. Quintelas, T. Tavares //Pesour. And Envirom. Biotechnol. – 2002. – Vol. 3. – № 4. – P. 193–202.
233. Rai, A.N. Nitrogenase derepresssion, its regulation and metabolic changes associated with diazotrophy in the non–heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryanum* PCC 73110 [Текст] / A.N. Rai, M. Borthakur, B. Bergman //Journal of General Microbiology. – 1992. – T. 138. – №. 3. – P. 481–491.
234. Rai, L.C. A Morphometric and X–ray Energy Dispersive Approach to Monitoring pH–Altered Cadmium Toxicity in *Anabaena flos–aguae* / L.C. Rai, E. Jensen, W. Rachlin // An. Environ. Contam. Toxicol. 1990. – V. 19. – P. 479–487.
235. Raize, O. Mechanisms of biosorption of different heavy metals by brown marine macroalgae [Текст] / O. Raize, Y. Argaman, S. Yannai // Biotechnol. and Bioeng. – 2004. – V. 87. – № 4. – P. 451–458.
236. Role of a cyanobacterial cover on structural stability of sandy soils in Sa-

- helian part of western Niger [Текст] / I.O. Malam, Y. Le Bissonnais, C. Defarge, J. Trichet // *Geoderma*. – 2001. – V. 101. – № 3–4. – P. 15–30.
237. Schröder, P. Phytoremediation of organic xenobiotics–Glutathione dependent detoxification in Phragmites plants from European treatment sites [Текст] / P. Schroder, D. Daubner, H. Maier, J. Neustifter, R. Debus // *Bioresource technology*. – 2008. – T. 99. – №. 15. – P. 7183–7191.
238. Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. [Текст] / T. T. Duong, S. Morin, O. Herlory Feurtet-Mazel, A. M. Coste, A. Boudou // *Aquatic Toxicology*. – 2008. – №1. – P. 19–28.
239. Shelley, D. Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes [Текст] / D. Shelley, K. Jasvinder // *Genome biology*. – 2002 – № 3. – P. 94–104.
240. Singh, A.K. Effect of cement dust treatment on some phylloplane fungi of wheat [Текст] / A. K. Singh, B. Rai // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 1990. – T. 49. – №. 3–4. – P. 349–354.
241. Slaba, M. Selective recovery of Zn²⁺ from waste slag from a metal-processing plant by the microscopic fungus *Verticillium marquandii* [Текст] / M. Slaba, J. Dlugonski // *Biotechnol. Lett.* – 2000. – V. 22. – № 21. – P. 1699–1704.
242. Slaveykova, V.I. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris* [Текст] / V.I. Slaveykova, K.J. Wilkinson // *Environmental science & technology*. – 2002. – T. 36. – №. 5. – P. 969–975.
243. Sorbtion of metals by extracellular polymers from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa flos-aquae* strain C 3–40 [Текст] / D.L. Parker, J.E. Michallick, M.J. Plude, T.P. Clark, L. Egan, J.J. Flom, L. C. Rai, H.D. Kumar // *J. Appl. Phycol.* – 2000. – Vol. 12. – № 3. – P. 219–224.
244. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. Institute of Marine Research. – Norway. – P. 25.

245. Sterritt, R. Interaction off heavy metals with bacteria [Текст] / Sterritt R., Lester J. // The science of the Total Environment. – 1980. – Vol.14. – P. 5–17.
246. Stružňka, L. The role of astroglia in Pb–exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity / L. Stružňka, M. Chalimoniuk, G. Sulkowski // Toxicology. – 2005. – Vol. 212. – № 2–3. – P. 185–194.
247. Taylor, C. E. Maintenance and breakdown of the Hydra–Chlorella symbiosis: a computer model [Текст] / C. E. Taylor, L. Muscatine, D. R. Jefferson // Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences. – 1989. – T. 238. – №. 1292. – P. 277–289.
248. Taylor, G. Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* straus [Текст] / G. Taylor, D.J. Baird, A.M.V.M. Soares // Environ. Toxicol.and Chem. – 1998. – Vol. 17. – № 3. – P. 412–419.
249. Thompson, S.L. Comparison of the toxicity of chromium III and chromium VI to cyanobacteria [Текст] / Thompson S.L., Manning F.C.R., Mc Coll S.M. // Bull. Environ. Contam. and Toxicol (KÝ). – 2002. – Vol. 69. – № 2. – P. 286–293.
250. Tian J. Changes in ultrascture and antioxidant system of alga (*Dunaliella salina*) during accumulation to enhanced ultraviolet–B radiation [Текст] / J.Tian, J. Yu // J. Photochem. and Photobiol. – 2009. – V.97. – №3. – P. 152–160.
251. Tobin, J.M. Uptake of Metal Ions by *Rhizopus arrhizus* [Текст] / J. M. Tobin, D.G. Cooper, R.J. Neufeld // Biomass, Appl. Environ. Microbiol. – April 1984 . – Vol. 47. – № 4. – P. 821–824.
252. Vadkertiova, J. Metal tolerance of yeast isolated from water, soil and plant environments [Текст] / J. Vadkertiova, E. Slavikova // J. Basic Microboil. – 2006. – Vol. 72– № 2. – P. 145–152.
253. Volesky, B. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae* [Текст] / B.Volesky, H. A. May–Phillips //Applied Microbiology and Biotech-

- nology. – 1995. – T. 42. – №. 5. – C. 797–806.
254. Volesky, B. Yeasts–biosorbents of heavy metals [Текст] / Volesky B., May–Phillips // Mikrobiol Z. – 2004. – Vol. 66. – P. 91–103.
255. Waters, C.M. Quorum sensing: Cell–t–cell communication in bacteria [Текст] / Waters C.M., Bassler B.L. // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2005. – Vol. 21. – P. 319–346.
256. Ye, J. Biosorption of chromium from aqueous solution and electroplating wastewater using mixture of *Candida lipolytica* and dewatered sewage sludge [Текст] J. Ye et al. // Bioresource technology. – 2010a. – Vol. 101. – №. 11. – P. 3893–3902.
257. Yilmazer, P. Saracoglu N. Bioaccumulation and biosorption of copper(II) and chromium(III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast [Текст] / Yilmazer P., N. Saracoglu // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 84. – Issue 4. – P. 604–610.
258. Zouboulis, A.I Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal–polluted soils [Текст] / A.I. Zouboulis, M.X. Loukidou, K.A. Matis // Process Biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – Issue 8. – P. 909–916.