

На правах рукописи

Горностаева Елена Анатольевна

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

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии агрономического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Вятская государственная сельскохозяйственная академия»

Научный руководитель: **Домрачева Людмила Ивановна,**
доктор биологических наук, профессор кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии агрономического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Вятская государственная сельскохозяйственная академия»

Официальные оппоненты: **Широких Александр Анатольевич,**
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого", ведущий научный сотрудник

Шабает Валерий Павлович,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской Академии наук», ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра Российской Академии наук», г. Апатиты

Защита диссертации состоится «19» мая 2015 г. в «15» часов 30 минут в аудитории М-2 на заседании Диссертационного совета Д 501.002.13 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте <http://soil.msu.ru/zashchita-dissertatsii>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Зенова Галина Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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 микромицеты, 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 комплексов (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 альго-цианобактериальные 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 ЦБ снижаются интенсивность биохемилюминесценции (БХЛ), дегидрогеназная и каталазная активности, концентрация хлорофилла *a*; возрастают концентрации феофитина и малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Установлен высокий уровень сорбционной активности по отношению к ионам меди (II) и никеля (II) у альгологически чистой культуры почвенной ЦБ *Nostoc linckia* (до 60 %) и природных биопленок с доминированием ЦБ 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 ТМ 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 ЦБ в фототрофных сообществах (до 80 %) и с абсолютным доминированием их безгетероцистных форм.

Установлено, что предпосевная цианобактериальная инокуляция семян пшеницы и гороха *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 ЦБ *N. linckia* и *Fischerella muscicola* приводит к стимуляции извлечения ионов меди (II) 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 ОС на основе особенностей функционирования клеток почвенных ЦБ. Усовершенствована методика тестирования степени токсичности среды по дегидрогеназной активности клеток почвенных ЦБ с использованием метода количественного определения формазана. Природные цианобактериальные биопленки с доминированием ЦБ 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.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на 20 российских конференциях (Пушино, 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 46 работ, из них 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ. 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. Калинину, 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

Объектами исследования были почвенные альгологически чистые культуры ЦБ (*Nostoc linckia* (Roth) Vorn. et Flah. № 271, *Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. № 300) из коллекции фоторофных микроорганизмов кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА, а также природные цианобактериальные биопленки (с доминированием *Nostoc commune* и с доминированием р. *Phormidium*).

ЦБ *N. linckia* была выделена в чистую культуру из дерново-подзолистой пахотной почвы Учебного хозяйства Вятской ГСХА, а *Fisch. muscicola* – из дерново-подзолистой луговой почвы Оричевского района Кировской области.

Природные пленки с доминированием ЦБ *N. commune* – многовидовые сообщества фототрофных и сапротрофных микроорганизмов, способные развиваться в массе на поверхности почвы. Биопленки отобраны с поверхности подзолистой песчаной почвы, техногенно преобразованной вдоль обочин шоссе и железной дорог на окраине г. Дзержинска Нижегородской области, который является одним из экологически неблагоприятных городов России.

Природные пленки ЦБ с доминирование безгетероцистных (БГЦ) ЦБ р. *Phormidium* включают следующие виды ЦБ: *Ph. ambiguum*, *Ph. boryanum*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Plectonema boryanum*. Пленки отобраны с поверхности почвы в промышленной зоне г. Кирова.

В опытах по изучению роли цианобактериальной обработки семян высших растений (горчица белая (*Sinapis alba*), горох (*Pisum sativum*) сорта Лучезарный, пшеница (*Triticum aestivum*) сорта Ирень) при выращивании в медьзагрязненной почве в качестве инокулята использованы почвенные ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola*.

Образцы пахотных почв для изучения влияния меди на почвенные цианобактериальные сообщества с территории учебно-опытного поля Вятской ГСХА, а так же пробы почвогрунтов с территории горно-металлургического комбината (г. Владикавказ) отбирались по общепринятым методикам.

Методы исследования

Методы исследования почвенной биоты. Численность клеток водорослей и ЦБ определяли методом прямого счета под микроскопом (Домрачева и др., 1985). Длину мицелия измеряли по Л.М. Полянской (1996). Соотношение бесцветных и меланизированных форм микромицетов определялось прямым микроскопированием согласно аттестованной методике «Определение токсичности проб почв методом биоиндикации по соотношению микромицетов с окрашенным и бесцветным мицелием» № 224.03.13.048/2009. Титр клеток ЦБ в водных культурах определяли с помощью камеры Горяева (Практикум..., 2005).

Методы исследования химических характеристик субстратов. Определение содержания подвижных и валовых форм ТМ было проведено методами инверсионного вольтамперометрического (ИВА) анализа на приборе «Экотест-ВА» с датчиком «Модуль ЕМ-04» (Сборник ..., 2004) 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.».

Активность каталазы (АК) определялась газометрически (Хазиев, 2006) в модификации для ЦБ.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в культурах ЦБ анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ. За основу взята

методика определения ПОЛ в растительных тканях (Лукаткин, 2002) в модификации для цианобактерий (Огородникова и др., 2010).

Содержание хлорофилла а и феофитина определяли по монокроматической методике на спектрофотометре Spеcol-1100 при двух длинах волн – 750 и 665 нм (Neelam, Meenu, 2009).

Кислотность среды (рН почвенной вытяжки) измеряли при соотношении почва: вода=1:2,5 на рН-метре «рН-150МИ».

Способ очистки водного раствора, содержащего соль меди, от ионов меди. Способ характеризуется тем, что проводят контактирование водного раствора, содержащего 20 мг $\text{Cu}^{2+}/\text{дм}^3$, с 0,2 г суспензии гомогенизированной (при 1-5 минут при 9000 об./мин) природной цианобактериальной биопленки, выращенной в течение 0,5–2 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 ПДК=0,1 мг/ дм^3 и ниже. По предлагаемому способу извлечения ТМ из промышленных и сточных вод получено решение о выдаче патента на изобретение.

Определение интенсивности биохемилюминесценции (БХЛ) почвенных ЦБ в условиях загрязнения медью и никелем проводили с помощью регистрации кинетической кривой спонтанной люминолнезависимой хемилюминесценции (биохемилюминометр БХЛ-07). В измерительную кювету вносили 1 мл взвеси ЦБ, помещали в измерительную камеру на 30 секунд и включали режим термостатирования (+37° С).

Тетразольно-топографический метод определения жизнеспособности клеток ЦБ. В качестве маркерных признаков жизнеспособности клеток почвенных ЦБ был выбран показатель образования в живых клетках кристаллов формазана красного цвета из бесцветного 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (индуцируется деятельностью фермента дегидрогеназы) (Домрачева и др., 2008).

Количественное определение формазана в культуре *Nostoc linckia* проведено на приборе Spеcol-1100 с предварительным разрушением клеточной стенки ЦБ (Огородникова и др., 2013).

Оценка достоверности результатов базируется на основе глубокого анализа материалов, полученных в ходе лабораторных и полевых исследований (исследования проводились на базе Вятской ГСХА и аккредитованной научно-исследовательской экоаналитической лаборатории ВятГГУ) с использованием классических статистических методов

(коэффициенты корреляции) и с применением современного программного обеспечения (Microsoft Excel 2007, Statistica 6.0, MapInfo 7.5), показавших точность и воспроизводимость полученных данных. Погрешность в приведенных табличных данных представляет из себя границы доверительного интервала при $P=0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура фототрофных микробных сообществ почв и грунтов техногенных территорий

Антропогенная нагрузка на природные экосистемы приводит к активной циркуляции в них широкого спектра продуктов техногенеза. Вокруг предприятий-загрязнителей формируются локальные аномалии, где содержание ТМ может превышать ПДК в десятки и сотни раз. В тоже время, как показывают многочисленные публикации, в загрязненных почвах сохраняется высокая активность почвенной микрофлоры (Дубовик, 1995; Глазовская, Геннадиев, 1995; Заварзин, 2003; Кузякина, 2004; Соколов и др., 2010; Евдокимова, 2014).

Исследования почв и грунтов в зоне действия горно-металлургического комбината (ГМК) показали, что даже при очень высоком содержании в них ТМ наблюдается вегетация фототрофных микроорганизмов (МО). При этом участие ЦБ в структуре альго-цианобактериальных сообществ колеблется от 87 до 97 % (табл. 1).

Таблица 1

Структура альго-цианобактериальных сообществ в зоне действия горно-металлургического комбината

№ участка	Содержание тяжелых металлов, мг/кг					Структура альго-цианобактериальных сообществ, %	
	Cu	Ni	Pb	Cd	Zn	Водоросли	Цианобактерии
1	46,25±0,35	25,01±0,10	185,00±17,20	119,00±18,00	1400±106,06	12,48	87,52
2	2895,75±3,18	42,75±0,36	7736,00±5,65	298,75±4,59	8187,50±159,00	10,83	89,17
3	91,50±1,41	5,80±0,31	829,25±14,5	34,25±0,35	3350,00±144,0	2,62	97,38
ПДК (ОДК)	3,0	4,0	6,0	0,5	23,0		

Примечание: жирным шрифтом выделены самые высокие значения содержания металлов в почве.

Доминирование ЦБ в загрязненных почвах предполагает наличие различных механизмов адаптации к ТМ у этих организмов и делает их перспективными объектами в процессах биомониторинга (в частности,

выявление информативных показателей функционирования ЦБ при действии токсикантов) и биоремедиации.

Изменение интенсивности биохемилюминесценции цианобактерии *Nostoc linckia* под влиянием ионов меди

Одним из перспективных показателей для определения жизнеспособности клеток является интенсивность БХЛ веществ клеток некоторых организмов (Кудряшева и др., 2002; Пестова, 2007; Погосян и др., 2009). Молекулами эмиттерами могут быть очень многие соединения, в том числе хлорофилл *a*, один из фотосинтетических пигментов у ЦБ. В работе была использована 2-х месячная культура почвенной ЦБ *N. linckia*, токсикант – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, с оптимальным титром – $1,5 \cdot 10^8$ кл./мл. Для выявления реакции ЦБ *N. linckia* на действие ионов Cu^{2+} в растворе использовали концентрации ТМ (0,1; 1; 10 мг/дм³) и варьировали со временем экспозиции – 12 и 24 ч. Через 12 ч наблюдается планомерное снижение интенсивности БХЛ с увеличением концентрации ТМ в растворе, содержащем ЦБ ($r_{\text{П}}=0,99$) (рис. 1). Адаптация культуры к Cu^{2+} выражается в более интенсивном свечении хлорофилла по истечении 24 ч по сравнению с 12-часовым воздействием. Вероятно, это связано с тем, что метаболитный обмен ЦБ дает возможность клеткам перестраивать внутреннее функционирование клеток (Гапочка, 1999).

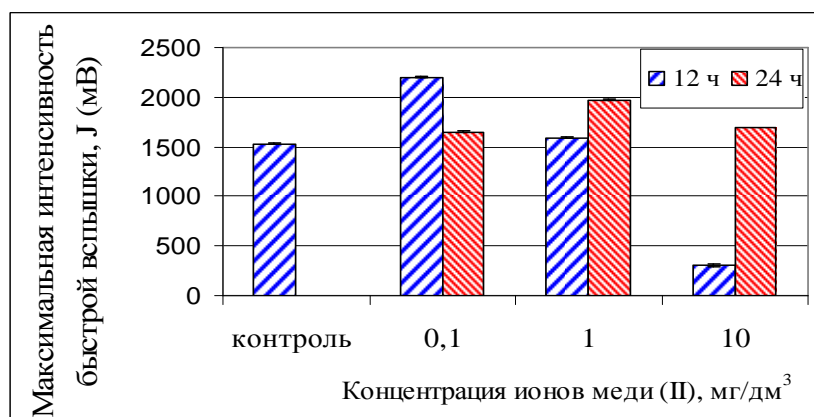


Рисунок 1. Изменение биохемилюминесценции почвенной цианобактерии *Nostoc linckia* под влиянием ионов меди (II)

Влияние ионов никеля на изменение физиологических процессов *Nostoc linckia*

В опыте был выявлен сильный ингибирующий эффект Ni^{2+} на интенсивность размножения и жизнеспособность испытуемой ЦБ (табл. 2). Определение жизнеспособности клеток почвенной ЦБ *N. linckia* методом ТТХ показало, что высокие концентрации Ni^{2+} при сохранении внешней структуры клеток приводят к почти полной гибели популяции ЦБ. Однако и погибшие клетки сохраняют сорбционные способности.

Таблица 2

Влияние ионов никеля (II) на интенсивность роста, жизнеспособность и уровень извлечения никеля из культуральной жидкости *Nostoc linckia*, %

Вариант, мг/дм ³	Снижение титра, %	Живые клетки, %	Уровень извлечения, %	
			Метод ИВА	Метод ААС
1. Контроль	0	96,48±4,32	0	0
2. Ni ²⁺ , 2	3,5	83,53±15,4	34,0±4,1	34,65±7,62
3. Ni ²⁺ , 20	7,5	2,94	41,25±5,0	58,87±12,95

В серии модельных опытов показано, что за 14 суток экспозиции *N. linckia* в среде, загрязненной ионами Ni²⁺, уровень биосорбции токсиканта достигал почти 60 %. При этом, чем выше концентрация Ni²⁺, тем выше уровень его цианобактериальной сорбции.

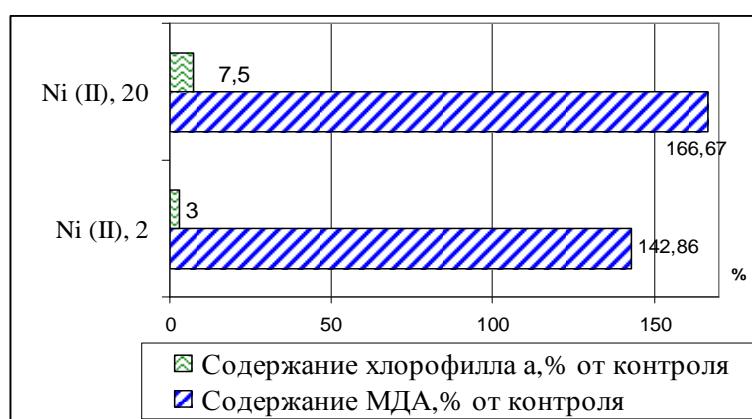


Рисунок 2. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в культуре *Nostoc linckia* при внесении ионов Ni²⁺, в % от контроля (контроль -100%)

Под влиянием ионов Ni²⁺ у ЦБ *N. linckia*, выявлены изменения и других физиологических показателей функционирования клеток: возрастание интенсивности окислительных процессов и накопления продуктов ПОЛ, снижение хлорофилла *a* (рис. 2). Вероятно, разрушение пигмента под действием Ni²⁺ становится одной из причин гибели популяции ЦБ.

Влияние ионов меди и никеля на жизнеспособность клеток цианобактерии *Nostoc linckia* и накопление в них формазана

В серии модельных опытов степень токсичности ионов Cu²⁺ и Ni²⁺ для *N. linckia* (титр 1,6·10⁸ кл./мл) по дегидрогеназной активности впервые определяли двумя методами: по жизнеспособности клеток ЦБ (микроскопический учет живых клеток с кристаллами формазана) и по количественному определению формазана спектрофотометрическим методом. Установлено, что под влиянием ионов Cu²⁺ снижается дегидрогеназная активность в клетках (рис. 3). Количественное определение показало, что под влиянием ТМ его концентрация снижается от 20 до 40 %, по сравнению с контролем (рис. 3). Сравнение результатов по оценке токсичности ионов Cu²⁺ и Ni²⁺, полученных разными методами, выявило тесную корреляцию между

ними ($R=0,82$). Поэтому метод количественного определения формазана в культуре *N. linckia* можно использовать для биотестирования сред, загрязненных ионами Cu^{2+} и Ni^{2+} .

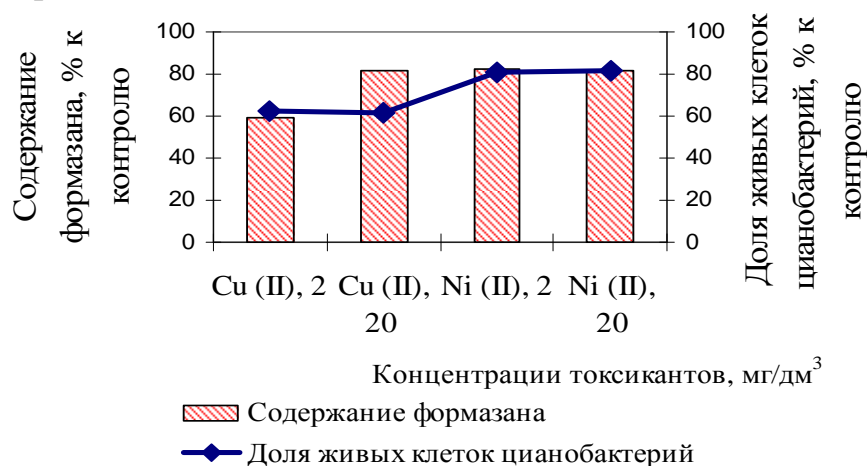


Рисунок 3. Влияние ионов меди и никеля на жизнеспособность клеток *Nostoc linckia* и накопление формазана

Самосборка природных биопленок с доминированием *Nostoc commune*

N. commune – вид, способный вступать в многообразие консортивных связей, а также обладающий высокой сорбционной активностью, в частности, к ТМ (Патова и др., 2000; Закирова, 2006; Домрачева, Кондакова, 2007; Зыкова, 2013). Доказательством морфологической целостности пленок *N. commune* было обнаружение явления их самосборки после механического разрушения. Для изучения возможности разрушенного сообщества к самосборке суспензию ЦБ, полученную в результате гомогенизации пленки, вносили в чашки Петри со стерильным песком.

Плотность организмов в данном сообществе велика и составляет около 2 млрд. клеток в 1 г сухой биопленки, при этом более 80 % приходится на долю доминанта. 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 пленки формирование биопленок пошло по другому пути: поверхность песка затягивалась налетом фототрофов, которые, в отличие от материнской колонии *N. commune*, было невозможно отделить от субстрата. Поэтому количественный учет МО проводили не на 1 г пленки, а на 1 см² «цветущего песка». При невозможности прямого сравнения результатов количественного учета фототрофов в 2-х типах пленок, можно сравнить результаты, характеризующие структуру сообществ (табл. 3). Выявлено, что и в дочерней биопленке доминирование сохраняется за *N. commune*, причем в дочерней пленке степень его доминирования даже возрастает. Сохраняют свои позиции

одноклеточные зеленые водоросли. Изменяется представительство ГЦ форм ЦБ (в сторону возрастания) и БГЦ форм (в сторону снижения долевого участия). Соотношение между азотфиксирующими и БГЦ формами в исходной и восстановленной пленках меняется незначительно (92,87 % к 7,13 % – в материнской; 94,85 % к 5,15 % – в дочерней). Выявленные изменения в структуре дочерней пленки столь невелики, что можно постулировать доказанным процесс самосборки биопленки *N. commune* из механически разрушенного сообщества.

Таблица 3

Фототрофный комплекс в природной и восстановленной биопленках
Nostoc commune

Группы фототрофов	Природная биопленка		Восстановленная биопленка	
	Численность, 10 ⁹ кл./г	Содержание (%)	Численность, 10 ⁷ кл./г	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.

Установлено, что в результате развития биопленок увеличивается устойчивость почвенных агрегатов, сетчато-нитчатая цианобактериальная структура скрепляет почвенные частицы и играет определенную противозерозионную роль (Дубовик, 1995; Malam et al., 2001). Данные, в таблице 4, показывают, что длина нитей сообществ в природной и восстановленной биопленках *N. commune* чрезвычайно велика и достигает около 9 км/г природной пленки и свыше 100 м/см² – восстановленной.

Таблица 4

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.

Таким образом, природные биопленки с доминированием *N. commune* – это структурированные комплексы с большой плотностью клеток организмов разных таксономических групп, обладающие высокой способностью к самосборке при их механическом разрушении.

Сорбционные способности природных биопленок *Nostoc commune*

Определение содержания ТМ в пленках *N. commune*, отобранных вдоль обочины автодороги (АД) и железной дороги (ЖД), показало, что данные сообщества являются природными сорбентами ТМ (рис. 4). Так, содержание таких ТМ, как Zn, Cd, Ni, Mn и Cu в биопленке превышает содержание этих элементов в почве под пленкой исследуемых экотопов (табл. 5).

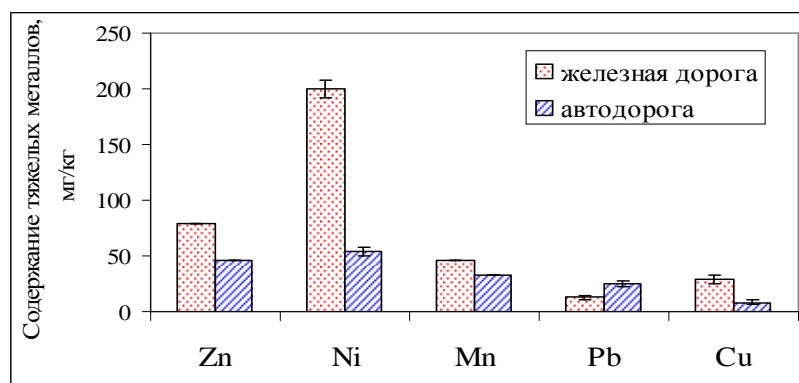


Рисунок 4. Содержание некоторых тяжелых металлов в природных пленках *Nostoc commune* различных экотопов

Таблица 5

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

Валовые формы						
Металлы	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.

Использование биопленок *N. commune* для очистки водных растворов от ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} показало, что форма контактирования (гомогенат или пленка) влияет на степень извлечения ТМ. Установлено, что емкость поглощения зависит от количества ТМ в пленке и растворе, а также формы контактирования (табл. 6).

Таблица 6

Остаточное содержание металлов в растворе после контакта с *Nostoc commune*

Вариант	Остаточное содержание ионов металла в растворе у железной дороги, %				Остаточное содержание ионов металла в растворе у автодороги, %			
	Cu^{2+}		Ni^{2+}		Cu^{2+}		Ni^{2+}	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
2 Cu^{2+}	4,7	2,6	-	-	20,5	4,5	-	-
20 Cu^{2+}	15,7	8,3	-	-	20,5	13,25	-	-
2 Ni^{2+}	-	-	6,5	2,0	-	-	11,5	1,5
20 Ni^{2+}	-	-	32,6	30,5	-	-	50,0	24,5
2 Ni + 2 Cu^{2+}	4,1	2,8	8,5	4,0	15,0	5,0	10,5	0,3
20 Ni + 20 Cu^{2+}	21,1	15,6	48,1	42,5	17,65	5,7	61,35	41,8

Примечание: «-» - не определяли; «А» - пленка; «Б» - гомогенат.

Влияние ионов меди и никеля на физиолого-биохимическую активность биопленок *Nostoc commune*

При стрессе у ЦБ возникает комплекс разнообразных изменений, которые часто приводят к различным внутриклеточным нарушениям. В этих условиях крайне важным является функционирование систем поддержания гомеостаза. Определение активности каталазы при воздействии ТМ на цианобактериальные сообщества *N. commune* показало, что происходит увеличение активности данного фермента. Изучение влияния Cu^{2+} и Ni^{2+} на интенсивность БХЛ биопленок выявило снижение интенсивности свечения при любой экспозиции (1 и 24 ч) в присутствии токсикантов (табл. 7). Наиболее токсичным действием обладает Cu^{2+} и смесь ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} . Параллельно снижению интенсивности БХЛ наблюдается уменьшение содержания хлорофилла *a* и увеличение содержания феофитина.

Таблица 7

Влияние ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} и продолжительности экспозиции на интенсивность биофлуоресценции биопленок, I_{\max} (мВ)

Концентрации, мг/дм ³	Вблизи автодороги		Вблизи железной дороги	
	Через 1 час	Через 24 ч	Через 1 час	Через 24 ч
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

Особенности функционирования сообществ почвенных цианобактерий с доминированием р. *Phormidium* при воздействии ионов меди и никеля

Опыт по исследованию жизнеспособности клеток ЦБ методом ТТХ после суточной экспозиции биомассы ЦБ с доминированием р. *Phormidium*, равной 0,0241 г/100 см³, показал, что при действии ТМ (20 мг/дм³) резко уменьшается количество жизнеспособных клеток (табл. 8).

Таблица 8

Влияние ионов меди и никеля на жизнеспособность клеток почвенных цианобактерий р. *Phormidium*, %

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

Наиболее сильным токсическим эффектом обладает Cu^{2+} . В целом, ТМ оказывают более сильный токсический эффект на культуру в гомогенизированном состоянии.

Показано, что ионы ТМ, их концентрации и время воздействия на ЦБ действуют по-разному. Так, через 1 сутки происходит возрастание АК во всех вариантах (рис. 5). В контроле увеличение АК объясняется размножением популяции ЦБ и, как следствие, – усилением ферментативной активности. При этом через 1 сутки АК в 3 и более раз выше, чем при 1-часовом воздействии ТМ. По-видимому, это связано со стимулирующим влиянием стресса на биопленки, конкретно, с усилением работы дыхательной системы.

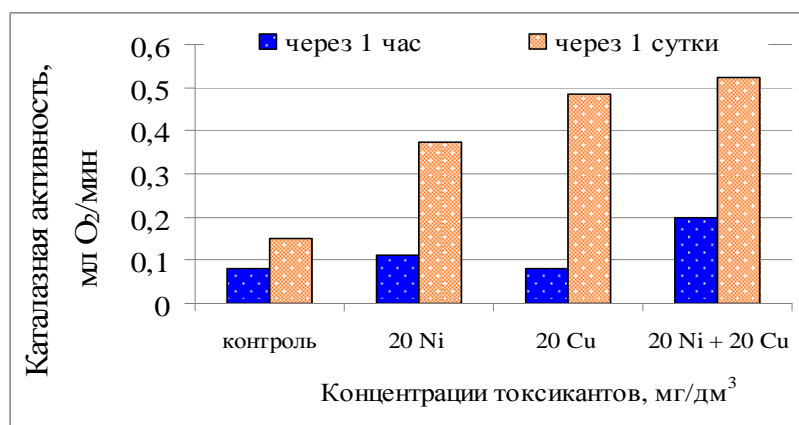


Рисунок 5. Влияние ионов металлов на каталазную активность биопленок с доминированием цианобактерии р. *Phormidium*

При 1-часовом воздействии Cu^{2+} в концентрации 20 мг/дм³ происходит сравнительно небольшое повышение ПОЛ (около 5,5 %), а одновременное присутствие солей Cu и Ni в тех же концентрациях увеличивает скорость ПОЛ в 2,5 раза (табл. 9).

Таблица 9

Влияние поллютантов на накопление малонового диальдегида в сообществах с доминированием р. *Phormidium* при разной длительности воздействия

Время действия ТМ, ч	Контроль	Ni^{2+}	Cu^{2+}	$\text{Ni}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$
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

Такой эффект может быть обусловлен, как минимум, двумя причинами: повышением общей концентрации ТМ и/или их синергетическим действием. Таким образом, ТМ инициируют процессы, вызывающие повреждение клеточных мембран и нарушение функционирования клеток. Через 24 ч контакта интенсивность ПОЛ во всех вариантах снижается. Это объясняется с двух позиций. Во-первых, культура адаптируется к изменившимся условиям (что подтверждают данные о возрастании АК). Во-вторых, клетки ЦБ под

действием ТМ гибнут, и, следовательно, прекращаются биохимические процессы окисления.

В контрольных вариантах в биопленке регистрируется высокое содержание хлорофилла *a* и практически отсутствует феофитин. Кратковременное действие ТМ приводит к снижению содержания хлорофилла *a* в вариантах с Cu^{2+} и смесью ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} , что одновременно сопровождается возрастанием количества феофитина. Через 1 сутки отмечается уменьшение количества феофитина и увеличение содержания хлорофилла. Накопление феофитина свидетельствует о разрушении хлорофилла *a* под влиянием ТМ. Увеличение содержания хлорофилла и снижение интенсивности ПОЛ в культуре ЦБ через 1 сутки действия поллютантов свидетельствует об адаптации ЦБ к стрессу (рис. 6).

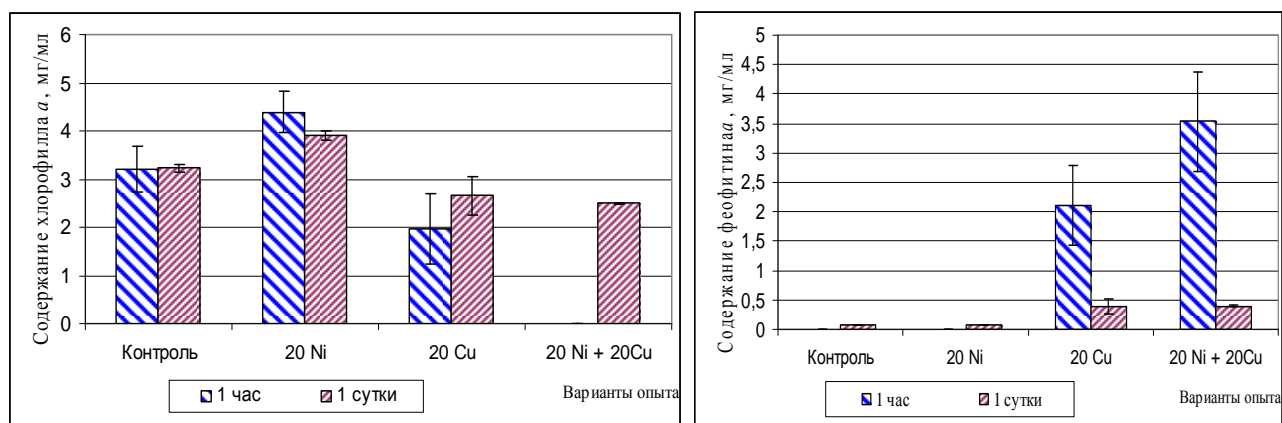


Рисунок 6. Влияние поллютантов на содержание хлорофилла *a* и феофитина в пленках с доминированием р. *Phormidium* при 1 ч и 24 ч воздействии

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

Цианобактериальный комплекс с биомассой $0,024 \text{ мг}/100 \text{ см}^3$ раствора через 24 ч экспозиции снижает концентрацию ТМ ($20 \text{ мг}/\text{дм}^3$) на 90-92 % в случае с Cu^{2+} и до 34-45 % при действии Ni^{2+} . При этом, большей способностью к уменьшению концентрации ТМ в растворе обладают ЦБ в виде гомогената. Вероятно, это обусловлено увеличением поверхности раздела фаз при гомогенизации и повышением сорбционной емкости.

Выявлена эффективная биомасса ЦБ для сорбции – $0,02 \text{ г}/100 \text{ см}^3$ раствора: происходит снижение содержания ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} до уровня ПДК и ниже. Уже через 1 ч после контакта ЦБ с Cu^{2+} содержание последних в растворе резко уменьшается: на 99 % в случае индивидуальной соли и на 96 % – смеси солей меди и никеля (табл. 10) (Получен патент на изобретение № 2501745). Однако более продолжительный контакт культуры с

токсикантом замедляет скорость снижения концентрации Cu^{2+} в растворе. Это становится заметным уже через 24 ч, а через 14 суток повышение концентрации Cu^{2+} в растворе становится очевидным. Определение остаточного содержания Ni^{2+} в фильтрате показало, что ТМ из смеси извлекается в меньшей степени, чем индивидуально. Данная зависимость вероятно обусловлена тем, что Cu^{2+} токсичнее Ni^{2+} и извлекается в первую очередь. Оптимальное время контактирования – 1 ч. Уже через 24 ч происходят процессы десорбции ионов ТМ в КЖ. Данный факт объясняется адаптацией МО, при которой культура выбрасывает часть ионов, поступивших первоначально, из клетки в ОС. На адаптацию МО указывают и следующие процессы: уменьшение феофитина в клетках, ослабление ПОЛ, увеличение АК и повышение содержания хлорофилла.

Таблица 10

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

Вариант	Продолжительность контакта	
	1 час	24 часа
Cu^{2+}	0,10±0,02	0,18±0,03
Cu^{2+} в смеси	0,25±0,07	0,29±0,02
Ni^{2+}	0,14±0,04	3,06±0,77
Ni^{2+} в смеси	0,61±0,15	3,69±0,92

Эффективность цианобактериальной инокуляции семян при выращивании растений в почвах, загрязненных медью

Для полевого микроделяночного опыта, заложенного в 2012 г., включающего 27 вариантов в 3-х кратной повторности, 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*).

Таблица 11

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.

Для предпосевной обработки семян использовали трехнедельные штаммы ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola*. Инокулят доводили до титра $8,3 \cdot 10^8$ кл./мл. Семена в инокуляте выдерживали в течение 12 ч. В качестве поллютанта использована медь в виде соли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях – 3 и 300 мг/кг почвы (табл. 11). Водные растворы токсикантов вносили в почву после посадки семян, проливая 10-15 см верхнего горизонта. Были выделены контрольные варианты для каждой серии опытов – с цианобактериальной обработкой семян, без ТМ. Почва дерново-подзолистая, среднесуглинистая; рН – 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 делянки – 0,24 м².

Влияние возрастающих концентраций ионов меди на почвенные альго-цианомикологические сообщества

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^{2+} на структуру фототрофных почвенных сообществ. 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^{2+} в почве до 300 мг/кг существенно увеличивает степень доминирования в сообществе ЦБ до 82,8 % с элиминацией ГЦ форм (рис. 7). Таким образом, БГЦ ЦБ являются наиболее устойчивыми МО к действию ТМ, увеличивая свою численность даже при высоких концентрациях Cu^{2+} .

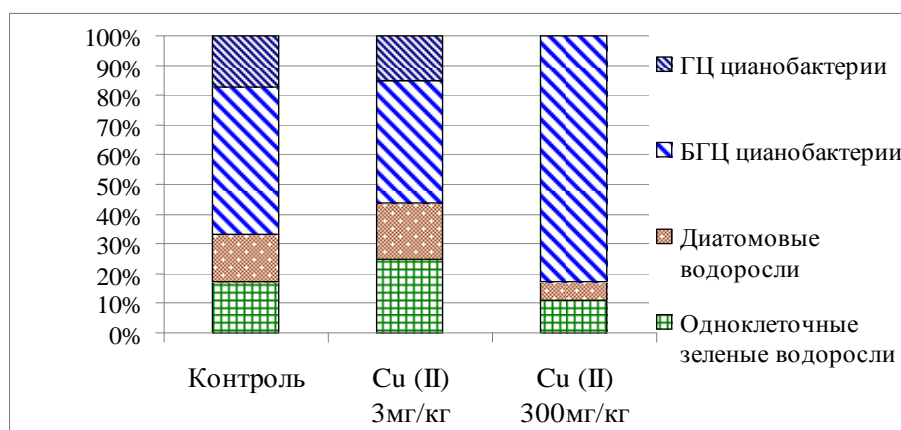


Рисунок 7. Влияние возрастающих концентраций меди на структуру фототрофных популяций под посевами пшеницы сорта Ирень, %

Диатомовые водоросли обнаружены во всех пробах, т.к. данные почвы являются хорошо увлажненными. Содержание диатомей в контроле и при концентрации Cu^{2+} 3 мг/кг практически одинаково по абсолютному значению – 600 и 670 тыс. кл./г (в процентном отношении – 15,56 и 19,14 %). При 100 ПДК их численность падает до 200 тыс. кл./г (6 % от общего числа фототрофов).

Изменение состава доминирующих группировок фототрофов под влиянием возрастающих концентраций ТМ практически не влияет на общую численность популяций: контроль – 3840 ± 750 тыс. кл./г, 3 мг/кг – 3500 ± 400 тыс. кл./г, 300 мг/кг – 3297 ± 370 тыс. кл./г. При этом в численном отношении прокариоты преобладают над эукариотами (табл. 12).

Таблица 12

Структура популяций фототрофных комплексов под посевами пшеницы, %

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

Наблюдается увеличение доли цианобактериального компонента в структуре фототрофных популяций при увеличении концентрации Cu^{2+} в почве. Это свидетельствует о повышенной стрессоустойчивости прокариот к «медному» стрессу по сравнению с эукариотами.

Микологическая индикация показала, что с увеличением содержания Cu^{2+} в почве происходит возрастание доли темноокрашенных форм и уменьшением доли грибов с бесцветным мицелием (рис. 8). При анализе количественных характеристик комплексов микромицетов установлено, что по суммарной длине мицелия максимальный показатель наблюдается при 3 мг/кг – 39,4 м/г, а минимальный – в контроле (30,3 м/г). В других вариантах длина мицелия составляет 33,1 и 32,2 м/г (150 и 300 мг/кг соответственно).

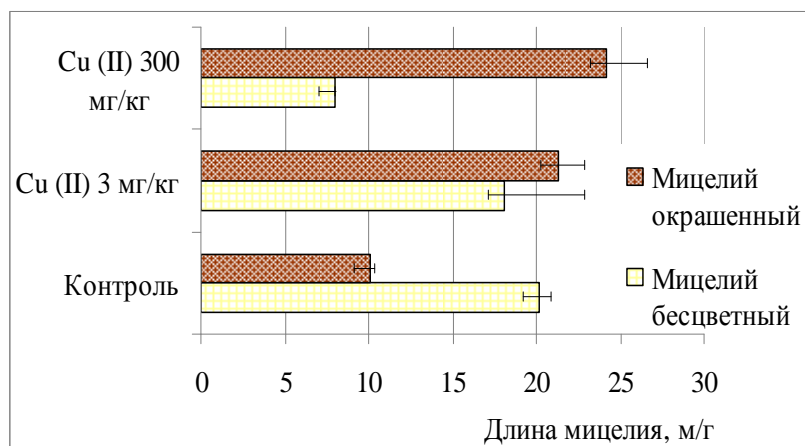


Рисунок 8. Структура популяции микромицетов под посевами пшеницы сорта Ирень, м/г

Особенности развития цианобактерий в почве, загрязненной ионами меди, под различными культурами

Изучение состояния популяций ЦБ, вегетирующих в почве, под посевами горчицы и пшеницы, загрязненной Cu^{2+} , показало, что значения численности клеток ЦБ в контроле различаются, с превалированием этого показателя под горчицей. Это вполне можно связать с особенностями строения корневой системы однодольных и двудольных растений (рис. 9). В то же время и угнетающее действие Cu^{2+} на развитие ЦБ наиболее четко проявляется в почве под горчицей: с увеличением концентрации Cu^{2+} уменьшается численность ЦБ ($r_{\text{II}}=0,96$).

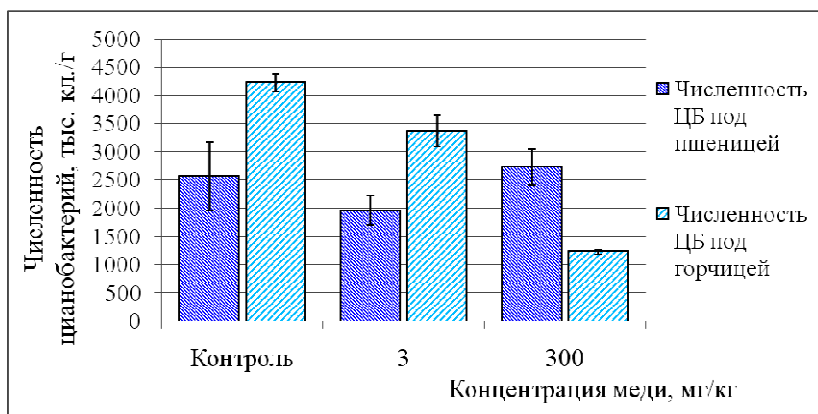


Рисунок 9. Численность цианобактерий в почве под посевами пшеницы и горчицы, тыс. кл./г

Влияние возрастающих концентраций ионов меди на развитие почвенных микромицетов под посевами гороха сорта Лучезарный

При прямом микроскопическом учете микромицетов под посевами гороха 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 ТМ (рис. 10).

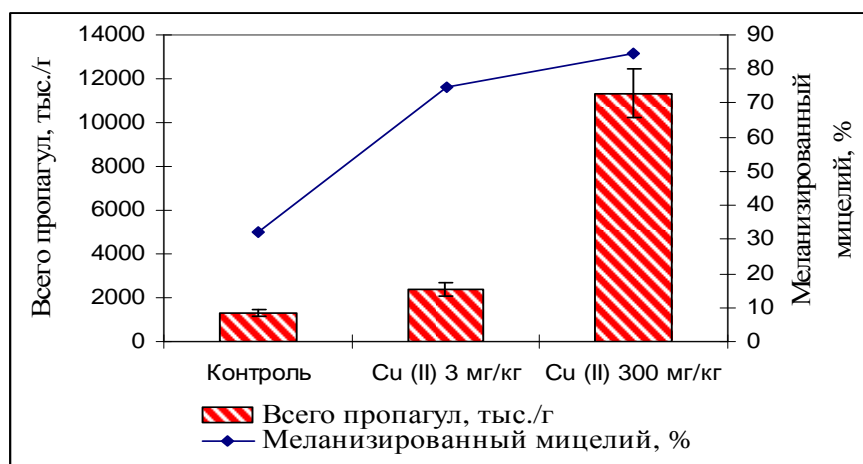


Рисунок 10. Влияние возрастающих концентраций меди на численность микромицетов и относительное обилие меланизированных форм грибов

Однако это обилие не сопровождается нарастанием грибной биомассы, так как загрязнение почвы Cu^{2+} приводит к морфологической аномалии –

резкому уменьшению длины пропагул. Если в контроле средняя длина мицелиального фрагмента – 32-40 мкм, при 300 мг/кг Cu^{2+} этот показатель необычайно мал – 3-6 мкм. Подобное стремительное измельчение клеток ранее отмечалось для бактерий, развивающихся в загрязненных почвах, независимо от характера загрязнения (Лысак, 2010).

Еще один аспект влияния Cu^{2+} на микокомплексы проявляется в изменении структуры их популяций: происходит резкое сокращение форм с бесцветным мицелием и возрастанием доли темноокрашенных грибов (рис. 10). Так, при фоновом содержании Cu^{2+} в почве меланизированные грибы составляют всего 32,3 % от общего количества. При максимальной концентрации ТМ этот показатель достигает более 80 %. Подобные изменения микокомплексов, вероятно, вызваны серией адаптационных реакций микромицетов, направленных на выживание в изменившихся условиях среды.

Влияние предпосевной цианобактериальной обработки семян на уровень сорбции ионов меди из загрязненной почвы высшими растениями

Определение содержания ТМ в семенах и вегетативной массе пшеницы и горчицы методом ААС показало, что Cu^{2+} перераспределяется в наземной части растения неравномерно, концентрируясь преимущественно в семенах. У гороха наблюдается противоположный эффект – содержание подвижных форм Cu^{2+} в вегетативной массе больше, чем в семенах (табл. 13).

Таблица 13

Влияние предпосевной инокуляции семян на вынос меди растением 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

Защитное действие цианобактериальной обработки семян *Nostoc linckia* пшеницы и гороха при выращивании в медьзагрязненной почве

Доказано, что при обработке семян пшеницы и гороха ЦБ *N. linckia* с увеличением концентрации ТМ в почве уровень поглощения Cu^{2+} падает: на 20 % ($r_{\text{II}}=-0,8865$ пшеница) и 73,3 % ($r_{\text{II}}=-0,7920$ горох) (рис. 11). Таким образом, снижение уровня поступления Cu^{2+} в надземную часть растения свидетельствует о защитном эффекте почвенной ЦБ *N. linckia* при высоких дозах ТМ, которое заключается в блокировании поступления ионов Cu^{2+} из почвы.

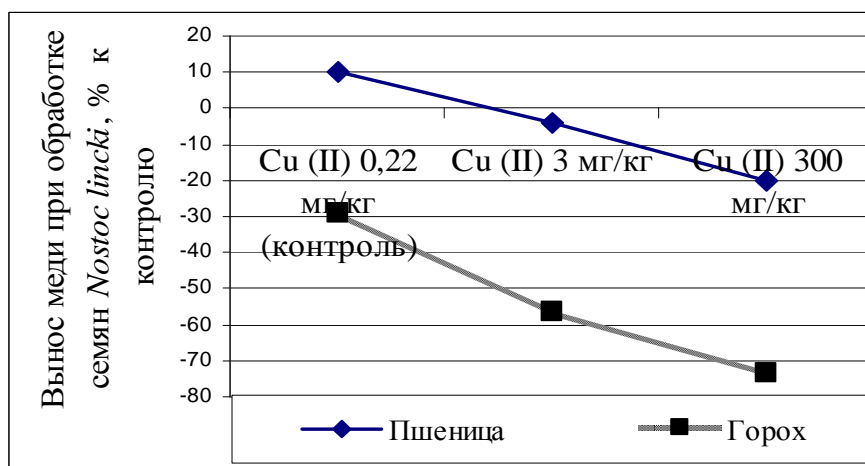


Рисунок 11. Содержание ионов меди (II) в наземной части растений, инокулированных *Nostoc linckia*, % к контролю

Биоремедиационные способности растительно-цианобактериальных комплексов

Предварительная обработка семян горчицы ЦБ *N. linckia* и *Fisch. muscicola* приводит к положительной динамике выноса ТМ из почвы (рис. 12). При этом, доза ТМ 300 мг/кг стимулирует и больший вынос Cu^{2+} растением. Вероятно, это связано с тем, что, встраиваясь в растение, ЦБ являются проводниками для выноса ТМ из почвы (Баулина, 2010).

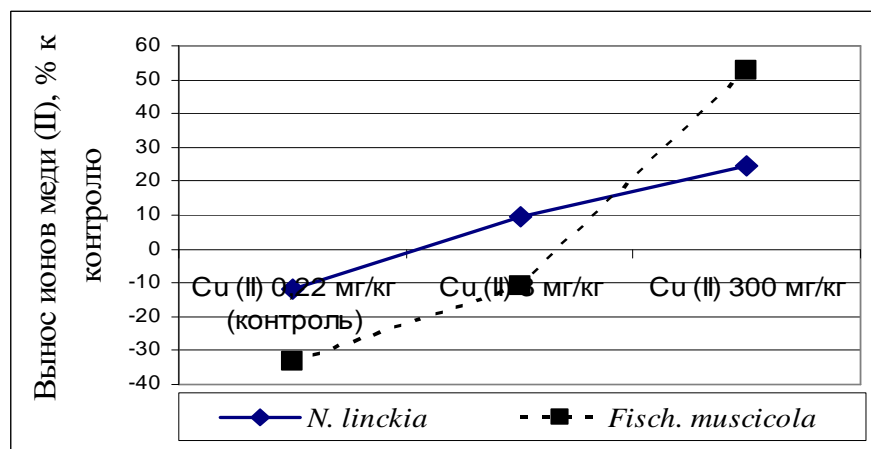


Рисунок 12. Содержание ионов меди (II) в наземной части горчицы, инокулированных *Nostoc linckia* и *Fischerella muscicola*, % к контролю

При использовании ЦБ *N. linckia* при 100 ПДК вынос Cu^{2+} горчицей (*Sinapis alba*) увеличивается на 24,6 % ($r=0,8184$), при инокулировании семян

почвенной ЦБ *Fisch. muscicola* – на 52,63 % ($r=0,9705$), по сравнению с контролем. Поэтому растительно-цианобактериальный комплекс «*Sinapis alba* + *Fischerella muscicola*» можно рекомендовать в качестве эффективного биоремедиатора почв, в которых наблюдается высокое содержание меди.

Таким образом, изучение различных комбинаций при инокуляции 3-х видов сельскохозяйственных культур и 2 видов ЦБ, показало, что при инокуляции семян пшеницы и гороха ЦБ *N. linckia*, проявляется защитное действие и снижается вынос Cu^{2+} из почвы. Ярко выраженный ремедиационный эффект наблюдается в ассоциации «*Sinapis alba* + *Fischerella muscicola*», которая обеспечивает существенный вынос Cu^{2+} из почвы.

ВЫВОДЫ

1. Доказано, что ионы меди и никеля влияют на 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 продукта перекисного окисления липидов. Впервые для оценки токсичности ТМ доказана возможность использования метода количественного определения формазана в клетках почвенных ЦБ *N. linckia*. Данные методики можно использовать для создания тест-системы на присутствие ионов меди (II) и никеля (II).

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, что гомогенизированная суспензия культуры пленок с доминированием р. *Phormidium* (0,2 г/1 дм³) при контактировании с 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). 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 поглотительная 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 инокуляция семян пшеницы и гороха почвенной 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 меди из почвы. Поэтому растительно-цианобактериальный комплекс «*Sinapis alba* + *Fischerella muscicola*» может служить основой для создания системы мероприятий, направленных на биоремедиацию почв, загрязненных медью.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ
ЖУРНАЛАХ ИЗ ПЕРЕЧНЯ ВАК РФ**

- Фокина А.И., Злобин С.С., Березин Г.И., Зыкова Ю.Н., Огородникова С.Ю., Домрачева Л.И., Ковина А.Л., **Горностаева Е.А.** Состояние цианобактерии *Nostoc linckia* в условиях загрязнения среды никелем и нефтепродуктами и перспективы ее использования в качестве биосорбента // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 1. – С. 69-75.
- Горностаева Е.А.**, Фокина А.И., Кондакова Л.В., Злобин С.С., Березин Г.И. Содержание тяжелых металлов и групповой состав фототрофов в природных биопленках *Nostoc commune* как отклик на особенности местообитания // Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии. – 2011. – № 4/1. – С.167-168.
- Горностаева Е.А.**, Злобин С.С., Сунцова Е.С., Елькина Т.С., Домрачева Л.И., Ашихмина Т.Я. Микробиологический статус почв в зоне действия Кирово-Чепецкого химического комбината // Теоретическая и прикладная экология. – 2012. – №3. – С. 44-49.
- Горностаева Е.А.**, Фокина А.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Домрачева Л.И., Лаптев Д.С., Сластиникова Е.М. Потенциал природных биопленок *Nostoc commune* как сорбентов тяжелых металлов в водной среде // Вода: химия и экология. – 2013. – №1. – С. 93-101.
- Домрачева Л.И., Трефилова Л.В., Ковина А.Л., **Горностаева Е.А.**, Малыгина О.Н., Новокшонова Н.В. Влияние способов предпосевной обработки семян лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) на всхожесть и интенсивность образования клубеньков // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – №3. – С.67-72.
- 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.