

## Адаптационные резервы почвенных природных биопленок с доминированием цианобактерий рода *Phormidium*

А. И. ФОКИНА<sup>1</sup>, Е. А. ГОРНОСТАЕВА<sup>2</sup>, С. Ю. ОГОРОДНИКОВА<sup>1, 3</sup>, Ю. Н. ЗЫКОВА<sup>2</sup>,  
Л. И. ДОМРАЧЕВА<sup>2,3</sup>, Л. В. КОНДАКОВА<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Вятский государственный гуманитарный университет  
610002, Киров, ул. Красноармейская, 26  
E-mail: annushka-fokina@mail.ru

<sup>2</sup> Вятская государственная сельскохозяйственная академия  
610017, Киров, Октябрьский просп., 133  
E-mail: dli-alga@mail.ru

<sup>3</sup> Институт биологии Коми научного центра УрО РАН  
167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28  
E-mail: svetaok2014@yandex.ru

Статья поступила 10.03.2015

Принята к печати 11.06.2015

### АННОТАЦИЯ

Изучено влияние ионов меди на физиолого-биохимические показатели природных биопленок. Биопленки являются многовидовыми наземными разрастаниями фототрофных микроорганизмов с доминированием цианобактерий рода *Phormidium*. Установлено, что через час после воздействия ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (20 мг/дм<sup>3</sup>) снижается концентрация хлорофилла *a* в цианобактериальной суспензии, появляется феофитин, усиливается перекисное окисление липидов. Через сутки экспозиции микроорганизмы адаптируются, о чем свидетельствует усиление каталазной активности, снижение интенсивности перекисного окисления липидов и восстановление хлорофилла *a*. При одностороннем контакте гомогенизированной биопленки с медьсодержащим раствором (0,031 г биомассы на 100 см<sup>3</sup> раствора) происходило снижение концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  до уровня ПДК. При этом степень очистки составляла до 99 %. Такое свойство биопленки является перспективной для создания биосорбента.

**Ключевые слова:** цианобактерии, биопленки, адаптация, биосорбция, биотестирование, потенциал.

Почвенные цианобактерии (ЦБ) – фототрофные микроорганизмы, для которых доказана возможность использования в качестве организмов-индикаторов и тест-организмов в процессе биомониторинга загрязненных территорий и определения степени токсич-

ности различных поллютантов, циркулирующих в окружающей среде. Кроме того, вследствие высокого уровня поглотительной активности, некоторые виды ЦБ можно использовать в качестве биосорбентов тяжелых металлов [Mierle et al., 1976; Гапочка, 1981;

John et al., 1983; Laegreid et al., 1983; Parker et al., 2000; Подольская и др., 2002; Raize et al., 2004; Шнюкова, 2005; Lengke et al., 2006; Бреховских, 2006; Домрачева и др., 2008, 2011; Шкундина и др., 2013]. ЦБ способны к образованию многовидовых природных сообществ, развиваясь на поверхности почвы в виде биопленок. В роли доминантов в подобных сообществах выступают различные виды гетероцистных и безгетероцистных ЦБ, имеющих тесные коммуникативные связи с фототрофными и гетеротрофными партнерами. Естественно предположить, что при использовании природных цианобактериальных пленок ответные реакции на воздействие ТМ отличаются от отклика чистых культур ЦБ и, соответственно, возрастают возможности практического использования биопленок в биотестовом и биосорбционном аспектах. Поэтому цель работы – оценить действие ионов меди на физиолого-биохимические показатели и сорбционные особенности почвенных природных биопленок с доминированием цианобактерий рода *Phormidium*.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы биопленки ЦБ, отобранные с поверхности дерново-подзолистой почвы опытного поля Вятской государственной сельскохозяйственной академии. Изучение видового состава альго-цианобактериальной микрофлоры биопленки проводили путем прямого микроскопирования в сочетании с методами чашечных и водных культур [Голлербах и др., 1969]. Доминировали в фототрофном сообществе биопленок следующие виды безгетероцистных ЦБ: *Phormidium ambiguum* (Gom.), *Phormidium boryanum* (Kütz.), *Leptolyngbya foveolarum* (Rabenhorst ex Gom) Anagn. et Kom., *Plectonema boryanum* (Gom.) Anagn. et Kom.

Биопленки ЦБ перед началом опыта выращивали в жидкой среде Громова № 6 с азотом в течение двух месяцев в люминесценте при постоянной температуре (+25 °C) и 12-часовом освещении (3000 лк).

Исследовано влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на цианобактериальное сообщество, а также  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрациях 20 и 2 мг/дм<sup>3</sup>.

Для экспериментов брали сульфаты двухвалентных металлов.

Все определяемые показатели можно разделить на две группы: 1) показатели жизнедеятельности цианобактерий, которые характеризуют их устойчивость к действию токсикантов – жизнеспособность (оценивали по активности дегидрогеназы), активность каталазы, интенсивность перекисного окисления липидов, содержание феофитина и хлорофилла *a* в биопленке, морфология поверхности клеток; 2) показатели способности ЦБ снижать концентрацию токсикантов в растворе – содержание токсиканта в растворе после контакта с биопленкой, количество и качество метаболитов, образующихся в ответ на действие токсикантов.

Для количественного определения активности дегидрогеназы в качестве субстрата использовали бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), который, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ), имеющий красную окраску [Домрачева и др., 2008]. Каталазную активность определяли газометрическим методом [Хазиев, 2005] 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 в нашей модификации [Лукаткин, 2002]. Феофитин и хлорофилл *a* определяли спектрометрическим способом по монохроматической методике [Standard procedure..., 2000]. Морфология поверхности клеток была изучена методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) с помощью электронного микроскопа JSM-6510 Scanning Electron Microscope [Дурнев, 2011]. Остаточное содержание ионов меди (II) в растворе определяли методом инверсионной вольтамперометрии на приборе Экотест-ВА с датчиком “Модуль ЕМ-04” [Сборник..., 2004]. Качественный состав органических соединений в культуральной жидкости после воздействия токсикантов определяли методом газовой хромато-масс-спектрометрии на хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010 Plus [Росинский и др., 2011].

Т а б л и ц а 1

## Общая схема проведения эксперимента

Показатель	Вариант				
	Контроль	Cu <sup>2+</sup> , 2 мг/дм <sup>3</sup>	Cu <sup>2+</sup> в смеси с Ni <sup>2+</sup> , 2 мг/дм <sup>3</sup>	Cu <sup>2+</sup> , 20 мг/дм <sup>3</sup>	Cu <sup>2+</sup> в смеси с Ni <sup>2+</sup> , 20 мг/дм <sup>3</sup>
Жизнеспособность клеток	+	-	-	+	+
Каталазная активность	+	-	-	+	+
Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ)	+	-	-	+	+
Содержание хлорофилла <i>a</i> , феофитина	+	-	-	+	-
Изучение поверхности клеток	+	+	+	+	+
Снижение концентрации ионов ТМ	+	-	-	+	+
Качественный состав культуральной жидкости	+	+	-	+	-

П р и м е ч а н и е. “+” – проведенные исследования, “-” – исследования не проводились.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая схема проведения эксперимента, отражающая изучение различных показателей при заданных концентрациях ионов металлов при их отдельном и совместном присутствии представлена в табл. 1.

**Влияние Cu<sup>2+</sup> на показатели устойчивости цианобактериального сообщества**

**Влияние Cu<sup>2+</sup> на жизнеспособность клеток цианобактерий.** Определение жизнеспособности клеток ЦБ по наличию в них кристаллов формаза показало, что Cu<sup>2+</sup> инактивирует дегидрогеназы, вызывая полную гибель клеток в гомогенизированных цианобактериальных пленках (табл. 2).

Подобный эффект можно объяснить тем, что в гомогенизированном состоянии доля клеток, подверженных воздействию токсиканта, больше, чем в виде пленки.

**Влияние Cu<sup>2+</sup> на каталазную активность цианобактериального комплекса.** Выявлено,

Т а б л и ц а 2

**Влияние Cu<sup>2+</sup> (20 мг/дм<sup>3</sup>) на жизнеспособность цианобактерий после суточной экспозиции**

	Цианобактерии, %	
	живые клетки	мертвые клетки
Контроль (пленка)	82 ± 5	18 ± 5
Контроль (гомогенат)	97 ± 1	3 ± 1
Cu <sup>2+</sup> (пленка)	0,2 ± 0,1	99,8 ± 0,2
Cu <sup>2+</sup> (гомогенат)	0	100

что через сутки действия токсиканта активность каталазы возрастает во всех изученных вариантах (рис. 1).

Возрастание активности каталазы в контрольном варианте в течение суток наблюдения, по-видимому, обусловлено ростом культуры и увеличением численности микробной популяции.

Каталазная активность при часовом воздействии ионами Cu<sup>2+</sup> (20 мг/дм<sup>3</sup>) близка к контролю, что свидетельствует об отсутствии токсического действия на микроорганизмы при краткосрочной инкубации с поллютантом.

При длительном воздействии ионами Cu<sup>2+</sup> происходит возрастание каталазной активности в клетках ЦБ: через сутки активность фермента более чем в 3 раза выше, чем в контрольном варианте.

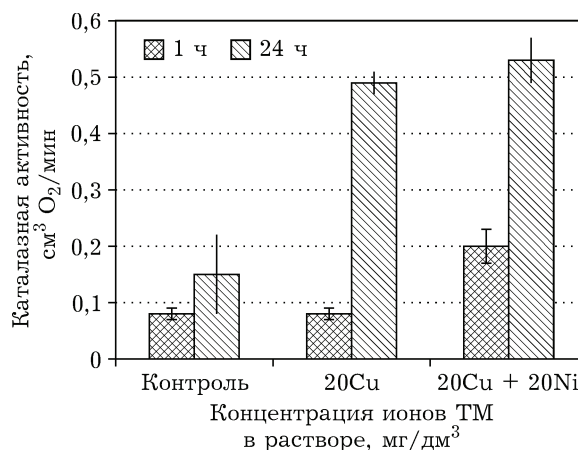


Рис. 1. Влияние Cu<sup>2+</sup> на каталазную активность сообщества микроорганизмов

Т а б л и ц а 3  
Влияние поллютантов на содержание малонового  
диальдегида в биопленке  
при разном времени воздействия, нмоль/см<sup>3</sup>

	Время воздействия, ч	
	1	24
Контроль	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Cu <sup>2+</sup> , 20 мг/дм <sup>3</sup>	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Cu <sup>2+</sup> в смеси с Ni <sup>2+</sup> , 20 мг/дм <sup>3</sup>	0,44 ± 0,03	0,15 ± 0,02

Большой токсический эффект на культуру оказывает смесь ионов Cu<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>. Уже при часовом воздействии смесью ионов ТМ каталазная активность оказалась в 2,5 раза выше, чем при воздействии ионами меди Cu<sup>2+</sup>.

Известно, что воздействие стрессовых факторов индуцирует накопление в клетках активных форм кислорода, к числу которых относится и пероксид водорода. Активация каталаз направлена на снижение концентрации токсичной для клеток перекиси водорода. Такая защитная реакция является универсальным механизмом адаптации организма к неблагоприятным условиям.

**Влияние Cu<sup>2+</sup> на интенсивность перекисного окисления липидов.** В клетке скорость перекисного окисления липидов в обычных условиях поддерживается на определенном, достаточно низком уровне, что обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. Активация процессов ПОЛ в клетке является одной из ранних ответных реакций на действие стрессора [Барабой, 1991; Курганова и др., 1997; Экологическая физиология..., 2008].

Установлено, что ионы меди Cu<sup>2+</sup> (20 мг/дм<sup>3</sup>) при одно- и 24-часовой инкубации не вызвали изменений интенсивности процессов ПОЛ в клетках ЦБ (табл. 3).

При совместном действии ионами Cu<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> на биопленки в течение часа отмечали значительное (в 2,5 раза), возрастание интенсивности процессов ПОЛ в клетках. Эти данные согласуются с результатами изучения активности каталазы. Высокая интенсивность процессов ПОЛ и активация каталазы в опыте с кратковременным действием ионами Cu<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> свидетельствуют о развитии окислительных процессов в клетках.

Более длительное, в течение 24 ч, выдерживание биопленки в присутствии ионов Cu<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> приводило к снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов до контрольного уровня. При этом в клетках, подверженных действию ионами меди, активность каталазы значительно превышала контрольный вариант. По-видимому, восстановление интенсивности ПОЛ до контрольного уровня является результатом эффективной работы антиоксидантной системы в клетках, о чем свидетельствует высокий уровень активности каталазы.

Вероятно, в течение суточной инкубации с растворами токсикантов культура адаптируется к неблагоприятным условиям за счет изменения активности биохимических процессов.

**Влияние Cu<sup>2+</sup> на содержание хлорофилла *a* и феофитина в фототрофных клетках микроорганизмов биопленки.** ЦБ обладают полноценным фотосинтетическим аппаратом, характерным для окисленных фотосинтетиков. Поэтому об устойчивости ЦБ, помимо изменения перечисленных показателей, можно судить по содержанию хлорофилла *a* или феофитина.

В контрольном варианте (без ТМ) содержание хлорофилла *a* оставалось стабильным на протяжении всего опыта: феофитина не обнаружено.

Через час контакта культуры с ионами меди Cu<sup>2+</sup> концентрация хлорофилла *a* в клетках снижалась, происходило разрушение молекул хлорофилла и образование феофитина. Накопление последнего приводит к снижению фотосинтетической способности культуры и, как следствие, к угнетению ее функционирования и роста.

Через сутки воздействия ионами Cu<sup>2+</sup> отмечали восстановление уровня хлорофилла *a* и снижение содержания феофитина, что свидетельствует об адаптации культуры к действию поллютанта (табл. 4).

Таким образом, результаты проведенных исследований по влиянию ионов Cu<sup>2+</sup> на основные показатели устойчивости цианобактериальных клеток позволяют сделать следующие выводы:

1) несмотря на высокую гибель клеток ЦБ через сутки экспозиции с растворами токсикантов, со временем происходит их адапта-

Влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на содержание хлорофилла *a* и феофитина в биопленке при разном времени воздействия

	Хлорофилл <i>a</i> , мг/см <sup>3</sup>		Феофитин, мг/см <sup>3</sup>	
	1 ч	24 ч	1 ч	24 ч
Контроль	3,20 ± 0,01	3,23 ± 0,01	0	0
$\text{Cu}^{2+}$ , 20 мг/дм <sup>3</sup>	1,98 ± 0,02	2,65 ± 0,03	2,20 ± 0,03	0,40 ± 0,01

ция к возникшим экстремальным условиям, о чем свидетельствует возрастание каталазной активности, снижение интенсивности ПОЛ и восстановление концентрации хлорофилла *a*;

2) показатели изменения физиологической активности биопленок с доминированием ЦБ рода *Phormidium* можно использовать для совершенствования системы биологического мониторинга.

**Влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на структуру поверхности клеток цианобактерий.** Исследование изме-

нений структурных особенностей биопленок методом РЭМ показало, что при любой продолжительности контакта с токсикантом наблюдается разрыв связей между компонентами биопленки (рис. 2).

В контрольном варианте (см. рис. 2, *a*) нити ЦБ облеплены бактериями-спутниками. Под действием токсикантов бактерии-спутники выстраиваются в отдельные самостоятельные колонии (см. рис. 2, *б, в, г*). Ионы металлов, взаимодействуя с компонентами слизистых чехлов ЦБ, нарушают физико-химические

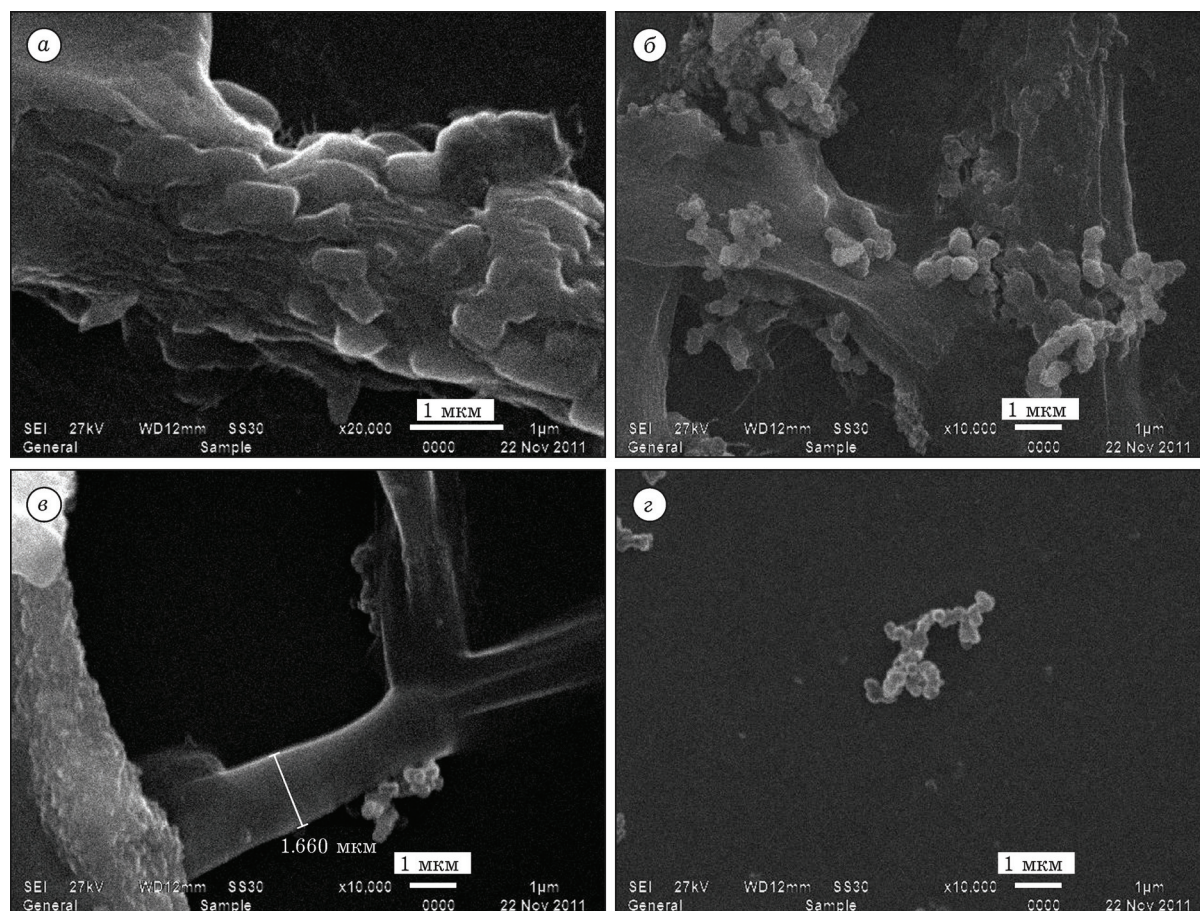


Рис. 2. Изменение структуры ЦБ под действием токсикантов: *a* – контрольный вариант; *б* – под действием смеси ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ ; *в, г* – под действием  $\text{Cu}^{2+}$

свойства чехла, делая его непригодным для существования в нем спутников.

**Влияние условий контакта культуры цианобактерий с  $\text{Cu}^{2+}$  на эффективность очистки растворов от токсиканта**

В данной серии опытов изучено влияние гомогенизации культуры ЦБ, соотношения биомассы ЦБ к объему раствора токсиканта и продолжительности контакта культуры с раствором соли меди на остаточное содержание ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе.

**Влияние гомогенизации биопленки на эффективность очистки раствора от токсиканта.** В жидкой среде диффузное сообщество фототрофных микроорганизмов по мере роста приобретает текстуру, состоящую из переплетенных трихомов и нитей. Работа с такой пленкой затруднена, так как доступ токсикантов к отдельным клеткам неодинаков. Однако именно пленочная структура является природным состоянием, формой наземного существования комплекса цианобактерий, поэтому сравнивали способность биопленок и гомогената снижать концентрацию токсиканта.

Для работы биопленку цианобактерий разбивали на гомогенизаторе Homogenizer type 302 (9000 об./мин). Выбирался такой режим гомогенизации, при котором разрушались слизистые чехлы трихомов, достигался выход отдельных нитей, но не повреждались отдельные клетки.

Опыт проводили с биомассой пленки  $0,024 \text{ мг}/100 \text{ см}^3$  раствора; исходная концентрация ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе составляла  $20 \text{ мг}/\text{дм}^3$ ; продолжительность экспозиции – одни сутки (табл. 5).

Таким образом, проведенные исследования показали, что пленочный комплекс ЦБ при заданных условиях эксперимента (био-

масса –  $0,024 \text{ мг}/100 \text{ см}^3$ , время контакта – 24 ч, исходная концентрация ионов  $\text{Cu}^{2+}$  –  $20 \text{ мг}/\text{дм}^3$ ) способен значительно (на 90–92 %) снижать концентрацию токсиканта. При этом несколько большей способностью к уменьшению концентрации ионов ТМ в растворе обладают ЦБ в виде гомогената, что обусловлено увеличением поверхности раздела фаз при гомогенизации и повышением сорбционной емкости.

Учитывая, что в данном эксперименте остаточная концентрация  $\text{Cu}^{2+}$  еще значительно превышает ПДК для водных объектов хозяйственно-питьевого водоснабжения ( $0,1 \text{ мг}/\text{дм}^3$ ), подбирали условия, которые позволили довести остаточное содержание токсиканта до уровня ПДК (или ниже). Все дальнейшие исследования по поиску оптимальных условий проводили с использованием гомогената ЦБ.

**Определение биомассы цианобактерий, необходимой для снижения концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  до уровня ПДК.** Целью данного этапа эксперимента стало выявление биомассы цианобактериального гомогената, при которой остаточное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  достигает значений меньше, чем ПДК ( $0,1 \text{ мг}/\text{дм}^3$  для воды объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования). Исходная концентрация токсиканта по иону ТМ –  $20 \text{ мг}/\text{дм}^3$ , продолжительность экспозиции – 1 час. Полученные результаты приведены на рис. 3.

При всех исследованных соотношениях биомассы к объему раствора токсиканта происходит значительное уменьшение кон-

Т а б л и ц а 5

**Влияние гомогенизации на остаточное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе**

	Остаточное содержание $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{мг}/\text{дм}^3$	Снижение концентрации $\text{Cu}^{2+}$ в растворе, %
$\text{Cu}^{2+}$ (гомогенат)	$1,63 \pm 0,01$	92
$\text{Cu}^{2+}$ (пленка)	$1,96 \pm 0,01$	90

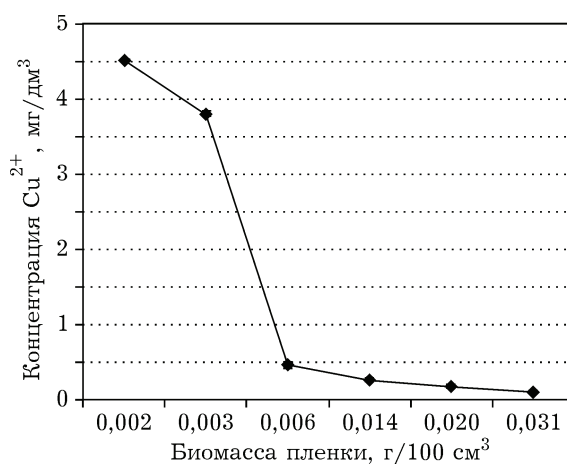


Рис. 3. Зависимость остаточной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе от биомассы ЦБ

центрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе (см. рис. 3). Однако при малых значениях биомассы ЦБ ( $<0,006 \text{ г/100 см}^3$ ) сорбционной емкости не хватает для глубокой очистки. При биомассе, близкой к  $0,006 \text{ г/см}^3$ , происходит резкое снижение остаточной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе. Наиболее эффективным является содержание около  $0,03 \text{ г/100 см}^3$  раствора: именно в этом случае происходит снижение концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  до уровня ПДК.

**Влияние продолжительности контакта пленки с раствором, содержащим  $\text{Cu}^{2+}$ , на остаточное содержание ионов металла в растворе.** Известно [Кузнецов и др., 2006], что максимальное связывание ионов металлов клеточной поверхностью происходит в первые минуты контакта. Затем следуют медленные процессы переноса металла в цитоплазму клетки. Это энергозатратный процесс. Поэтому возникла необходимость проанализировать влияние продолжительности контакта на остаточное содержание ионов ТМ в растворе.

При исходной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$   $20 \text{ мг/дм}^3$  остаточное содержание ионов металла определяли в культуральном фильтрате через 1 ч, 1 сут и 14 сут контакта. Использовали биомассу ЦБ, равную  $0,031 \text{ г/100 см}^3$  раствора токсикантов. Результаты опыта представлены на рис. 4.

Выявлено, что уже через час контакта культуры ЦБ с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  содержание ионов металла в растворе уменьшается на 99 %. Однако более продолжительный контакт культуры с токсикантом замедляет скорость

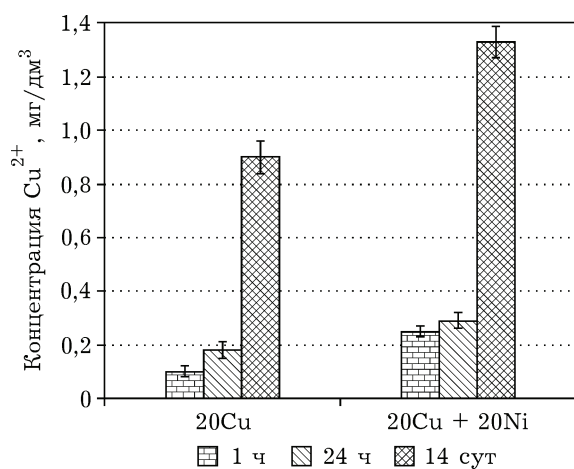


Рис. 4. Влияние продолжительности экспозиции раствора  $\text{CuSO}_4$  с биопленками ЦБ на остаточное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе

снижения концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе (происходит даже некоторое ее увеличение). Это наблюдается уже через сутки контакта, а через 14 сут повышение концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе становится очевидным. Наблюдаемый эффект можно объяснить с двух позиций. Во-первых, культура выбрасывает часть ионов, поступивших в первое время, из клетки в окружающую среду (таким образом проявляется адаптация организмов к условиям обитания). Во-вторых, повышение содержания металлов в растворе может быть вызвано разрушением клеточных стенок микроорганизмов и, соответственно, пассивным выходом ионов в раствор.

Могут одновременно оказывать влияние оба фактора, хотя уменьшение концентрации феофитина в клетках, снижение интенсивности ПОЛ, высокая каталазная активность и восстановление содержания хлорофилла *a* через сутки указывают прежде всего на адаптацию организмов.

Таким образом, выявлена способность гомотената ЦБ биомассой  $0,031 \text{ г/100 см}^3$  раствора снижать концентрацию ионов меди (II) при одночасовом воздействии до уровня ПДК. При этом из индивидуальных растворов с максимальной концентрацией  $20 \text{ мг Cu}^{2+}/\text{дм}^3$  степень очистки составляет 99 %. В растворах, содержащих  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ , концентрация меди снижается на 96 %. Поэтому возможно получение биосорбента, предназначенного для очистки от ионов меди небольших объемов загрязненной воды (бассейны, пруды и т. д.), применение которого, скорее всего, будет основано на использовании иммобилизованных микроорганизмов.

#### *Качественный состав органических соединений в культуральной жидкости*

Сорбционная способность ЦБ обусловлена интенсивным выделением внеклеточной слизи, состоящей из полисахаридов и липофильной фракции клеток. Кроме того, возможна дистанционная детоксикация, при которой связывание ионов металлов происходит экзополисахаридами в культуральной среде [Шнюкова, 2005]. Поэтому возникла необходимость анализа состава органических соединений в культуральной жидкости.

Качественный состав органических соединений в культуральной жидкости после воздействия токсикантов определяли методом газовой хромато-масс-спектрометрии на хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010 Plus. Пробоподготовка состояла в приготовлении вытяжки этиловым спиртом и четыреххлористым углеродом.

При исследовании культуральной жидкости контрольного варианта 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 важная роль принадлежит соединениям серы и азота. В частности экспериментально доказано, что внутри клетки большое значение в связывании ТМ играет глутатион и ферменты глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, поддерживающие его окислительно-восстановительное состояние [Музыка, 2000].

Предполагают, что глутатионовая система может служить первой линией обороны в системе защиты клеток от ТМ в период, предшествующий формированию такого важного инструмента защиты, как металлсвязывающие белки. Связывание металла происходит за счет свободных SH-групп [Саванина и др., 2003]. Кроме того, один из способов детоксикации ТМ – образование внутри клеток нерастворимых сульфидов [Кузнецов и др., 2006].

Поэтому исследовано влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на массовую долю азотсодержащих и серосодержащих соединений в массе всех органических веществ жидкости (рис. 5).

Как следует из представленных на рис. 5 данных, уже через сутки экспозиции культуры с растворами солей меди происходит резкое увеличение доли азотсодержащих соединений (в 3,3–3,5 раза) и несколько в меньшей степени – серосодержащих (в 2,1–3,0 раза).

Обращает на себя внимание тот факт, что чем выше концентрация  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе, тем меньше доля азот- и серосодержащих веществ.

К 14-м суткам вклад серосодержащих соединений в вариантах с ионами меди (II) практически сводится к нулю. При этом доля

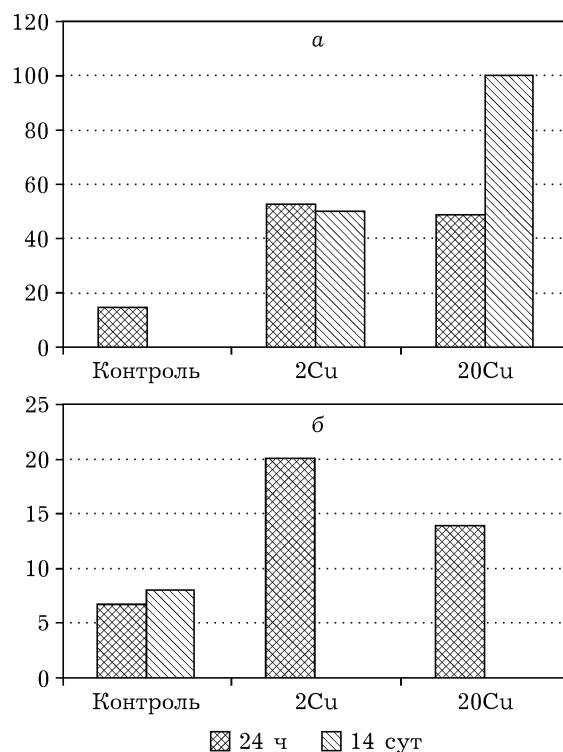


Рис. 5. Влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на массовую долю (%) азотсодержащих (а) и серосодержащих (б) соединений в общей массе всех органических веществ фильтрата

азотсодержащих соединений существенно возрастает (практически до 100 %).

Стимулирование образования азотсодержащих соединений, а также увеличение количества клеток, отвечающих за азотфиксацию в присутствии токсикантов, отмечено и другими авторами [Кадырова и др., 2007]. Существуют два основных объяснения происходящим явлениям. Присутствие ТМ вызывает процессы, способствующие биоразложению соединений, не содержащих серу и азот, или преобразование их в соединения, содержащие указанные элементы, а также выброс из клетки веществ, способствующих детоксикации [Галочка, 1981]. Преобразование в соединения с серой и азотом интенсифицирует процесс утилизации ТМ. Уменьшение серосодержащих соединений на 14-е сутки, возможно, связано с биоразложением углеводородного радикала и высвобождением соли меди с кислотным остатком, содержащим серу.

Под действием ионами  $\text{Cu}^{2+}$  разнообразие соединений резко уменьшается. Через сутки снижается количество углеводов, а аминов возрастает. Почти во всех вариантах уве-



личивается доля кетонов и уменьшается эфиров. Через 14 сут экспозиции с токсикантами в культуральной жидкости всех вариантов, подвергшихся воздействию меди, не удалось обнаружить углеводов, кислот и ангидридов, фосфорсодержащих соединений. Увеличивается количество кетонов и эфиров по сравнению с контролем.

Следует отметить, что разнообразие соединений в фильтрате снижается в ряду: контрольный вариант → 24-часовая экспозиция → 2-недельная экспозиция.

Таким образом, выявлено, что полярные соединения (непредельные углеводороды, карбоновые кислоты и ангидриды кислот, фосфорорганические соединения) участвуют в связывании ионов меди (II). Ионы меди (II) стимулируют образование азотсодержащих соединений, способствующих детоксикации. Этот факт может служить биоиндикационным признаком на присутствие соединений меди в окружающей среде.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что действие раствора с концентрацией ионов  $\text{Cu}^{2+}$  20 мг/дм<sup>3</sup> на биопленки с доминированием ЦБ р. *Phormidium* вызывает нарушение таких процессов жизнедеятельности клеток, как жизнеспособность, каталазная активность, интенсивность ПОЛ, содержание хлорофилла *a*. Под воздействием  $\text{Cu}^{2+}$  через час контакта концентрация хлорофилла *a* в растворе снижается, появляется феофитин, усиливается интенсивность процессов перекисного окисления липидов. Несмотря на высокую гибель клеток ЦБ, через сутки экспозиции с растворами токсикантов микроорганизмы адаптируются к возникшим экстремальным условиям, о чем свидетельствует высокая каталазная активность, снижение интенсивности процессов ПОЛ и восстановление уровня хлорофилла *a*. Данные физиолого-биохимические показатели чувствительны к действию токсикантов и могут быть использованы при разработке биосенсора.

Выявлено, что при одночасовом контакте водных растворов солей меди (II) с суспензией гомогенизированной биопленки в соотношении 0,031 г биомассы на 100 см<sup>3</sup> раствора происходит снижение концентрации ионов меди

(II) до уровня ПДК (в случае индивидуальной соли). При этом степень очистки составляет до 99 %. Такое свойство биопленки является перспективой для создания биосорбента. Однако к 14-м суткам экспозиции происходит увеличение концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в культуральной жидкости, что может указывать на адаптацию сообщества к действию металла и экскрецию токсиканта в окружающую среду.

Выявлено, что ТМ существенно влияют на специфику органических соединений, выделяемых в культуральную жидкость цианобактериальными комплексами, и следовательно, на биохимические процессы в клетках. Ионы меди (II) стимулируют образование азотсодержащих соединений, способствующих детоксикации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-3964.2015.5.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи совр. биологии. 1991. Т. 111, вып. 6. С. 923–931.
- Бреховских А. А. Защитные механизмы автотрофной цианобактерии *Nostoc muscorum* от токсического воздействия ионов кадмия: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006. 26 с.
- Гапочка Л. Д. Об адаптации водорослей. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1981. 79 с.
- Голлербах М. М., Штина Э. А. Почвенные водоросли. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1969. 228 с.
- Домрачева Л. И., Кондакова Л. В., Ашихмина Т. Я., Огородникова С. Ю., Олькова А. С., Фокина А. И. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности ЦБ в загрязненных средах // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 2. С. 23–28.
- Домрачева Л. И., Кондакова Л. В. Биоремедиационные возможности почвенных цианобактерий // Биологический мониторинг природно-техногенных систем / под общ. ред. Т. Я. Ашихминой, Н. М. Алалыкиной. Сыктывкар, 2011. С. 26–38.
- Дурнев Е. А. Электронная микроскопия микроорганизмов: Методические указания по выполнению лабораторных работ. Киров: Изд-во Вятск. гос. ун-та, 2011. 12 с.
- Кадырова Г. Х., Расулов Б. А., Джаббарова О. И., Халилов И. М. Биовосстановление засоленных почв цианобактериями // Микроорганизмы и биосфера, Москва, ноябрь 2007: тез. Междунар. науч. конф. М., 2007. С. 49–50.
- Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии. М.: Мир, 2006. 504 с.
- Курганова Л. Н., Веселов А. П., Гончарова Т. А., Синицына Ю. В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке // Физиол. растений. 1997. Т. 44, № 5. С. 725–730.

- Лукаткин А. С. Холодное повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
- Музыка Н. Г. Исследование роли глутатиона в ответе *Escherichia Coli* на действие различных оксидантов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2000. 28 с.
- Подольская В. И., Грузина Т. Г., Ульберг З. Р., Соколовская А. С., Грищенко Н. И. Особенности влияния мышьяка на рост бактерий и АТФазную активность плазматических мембран // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 1. С. 57–62.
- Росинский А. П., Алалыкин А. А. Газовая хромато-масс-спектрометрия. Киров, 2011. 37 с.
- Саванина Я. В., Лебедева А. Ф., Барский Е. Л. Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей // Вестн. МГУ. 2003. Сер. 16, № 3. С. 29–37.
- Сборник методик измерений массовой концентрации ионов меди, свинца, кадмия, цинка, висмута, марганца, никеля и кобальта методом вольтамперометрии на вольтамперометрическом анализаторе “Эко-тест-ВА”. М.: ООО “Эконикс-Эксперт”, 2004. 61 с.
- Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.
- Шкундина Ф. Б., Габидуллина Г. Ф., Ядыкина М. Г. Использование цианопрокарриотно-водорослевых ценозов при очистке сточных вод биологических очистных сооружений // Альгология. 2013. № 2. С. 217–228.
- Шнюкова Е. И. Аккумуляция ионов металлов экзополисахаридами *Nostoc Linckia* (Roth) Born. Et Fiach (Ceanopheta) // Там же. 2005. Т. 15, № 2. С. 172–181.
- Экологическая физиология растений: метод. пособие. Екатеринбург, 2008. 157 с.
- John M. Wood, Hong-Kang Wang. Microbial resistance to heavy metals // Environ. Sci. Technol. 1983. N 12. P. 582–590.
- Laegreid M., Joroif AlstadVt Dag Klaveness, H. Martln Selpt. Seasonal Variation of Cadmium Toxicity toward the Alga *Selenastrum capricornutum* Printz in Two Lakes with Different Humus Content // Environ Sci and Technol. 1983. Vol. 17, N 6. P. 357–361.
- Lengke M. F., Ravel B., Fleet M. E., Wanger G., Gordon R. A., Sontham G. Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold (III) – chloride complex // Ibid. 2006. Vol. 40, N 20. P. 6304–6309.
- Mierle G. M., Stoces P. M. Heavy metal tolerance and metal accumulation by planctonic algae // Trace substances and Environmental Health. 1976. Vol. XI. P. 113–122.
- Parker D. L., Michalick J. E., Plude J. L., Plude M. J., Clark T. P., Egan L., Flom J. J., Rau L. C., Kumar H. D. Sorption of metals by extracellular polymers from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* f. flos-aquae strain // J. Appl. Phycol. 2000. Vol. 12, N 3. P. 219–224.
- Raize O., Argaman Y., Yannai S. Mechanisms of biosorption of different heavy metals by brown marine macroalgae // Biotechnol. Bioeng. 2004. Vol. 87, N 4. P. 451–458.
- Standard procedure for the determination of chlorophyll *a* by spectroscopic methods. Institute of Marine Research. Norway, 2000. 25 p.

## Adaptation Reserves of Soil Biofilms with the Dominance of Cyanobacteria of the Genus *Phormidium*

A. I. FOKINA<sup>1</sup>, E. A. GORNOSTAEVA<sup>2</sup>, S. YU. OGORODNIKOVA<sup>1, 3</sup>, YU. N. ZYKOVA<sup>2</sup>,  
L. I. DOMRACHEVA<sup>2,3</sup>, L. V. KONDAKOVA<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Vyatka State University for the Humanities  
610002, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 26  
E-mail: annushka-fokina@mail.ru

<sup>2</sup> Vyatka State Academy of Agriculture  
610017, Kirov, Oktyabrskiy ave., 133  
E-mail: dli-alga@mail.ru

<sup>3</sup> Komi Science Centre, Institute of Biology, UB RAS  
167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya str., 28  
E-mail: svetaok2014@yandex.ru

The effect produced by copper ions on physiological and biochemical parameters of natural biofilms was studied. Biofilms are multispecific formations of phototrophic microorganisms with the dominance of the *Phormidium* cyanobacteria. It was established that the impact of  $\text{Cu}^{2+}$  ions ( $20 \text{ mg/dm}^3$ ) after 1 hour caused a decrease of chlorophyll in the biofilms. It also resulted in the appearance of pheophytin in the cyanobacterial suspension, and an increase of lipid peroxidation. In 24 hours the microorganisms got adapted, which was testified by the increased catalase activity, reduced lipid peroxidation, and restoration of chlorophyll. During a 1-hour contact of homogenized biofilm with copper solution (the ratio of 0,031 g. per  $100 \text{ cm}^3$  of the solution), copper ion (II) concentration reduced to the level of MPC. The purification rate constituted 99 %. This feature of biofilms could be used for creating a biosorbent.

**Key words:** cyanobacteria, biofilms, adaptation, biosorption, biotesting, potential.