

УДК 574.3. 556.531

Ю. М. Поляк, Т. Б. Зайцева, В. Н. Петрова, Н. Г. Медведева

**РАЗВИТИЕ МАССОВЫХ ВИДОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ
В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ
МЕТАЛЛАМИ**

Исследовано воздействие меди, никеля и цинка на рост, фотосинтетическую активность и синтез вторичных метаболитов основных возбудителей «цветения» воды — цианобактерий *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii*, *Anabaena variabilis* и *Aphanizomenon flos-aquae*. Показано, что в диапазоне концентраций 10^{-7} — 10^{-5} моль/л и выше тяжелые металлы могут не только одновременно полностью подавлять развитие одних цианобактерий, ингибировать рост других и стимулировать развитие третьих, но и индуцировать выделение в среду различных метаболитов, в том числе белков, внеклеточных полисахаридов, токсинов и одорирующих веществ. Повышенное выделение экзометаболитов негативно сказывается на формировании качества воды в водных экосистемах.

Ключевые слова: тяжелые металлы, цианобактерии, экзометаболиты, микроцистин, одоранты, экзополисахариды.

К числу наиболее важных последствий антропогенного воздействия на водные экосистемы относится массовое развитие цианобактерий (или «цветение» воды). Это явление стало обычным в водоемах практически всех природно-климатических зон. Многие цианобактерии образуют токсины, поэтому «цветение» воды сопровождается значительным ухудшением ее качества и представляет опасность для животных и человека [10]. Массовое развитие токсигенных видов может привести к гибели отдельных представителей морской фауны, заморам рыб, отравлению животных [30]. Ежегодно в мире регистрируются десятки тысяч случаев отравления людей вследствие употребления в пищу рыбы, моллюсков и других морепродуктов, содержащих токсины микроводорослей [19]. Цианотоксины обладают и канцерогенными свойствами.

Известным свойством цианобактерий является способность к образованию одорирующих веществ [16]. В период «цветения» количество веществ-одорантов заметно возрастает, что неблагоприятно сказывается на органолептических свойствах воды и представляет серьезную проблему для водопотребителей.

В регионах с развитой промышленной инфраструктурой проблема антропогенного загрязнения водных экосистем связана, как правило, с приори-

© Поляк Ю. М., Зайцева Т. Б., Петрова В. Н., Медведева Н. Г., 2011

тетными загрязнителями водоемов — тяжелыми металлами (ТМ). При поступлении в водоем ТМ не подвергаются естественной детоксикации и, поэтому, могут длительное время циркулировать по цепям экосистемы, оказывая негативное влияние на различные компоненты гидробиоценозов [1].

В настоящее время недостаточно изучено влияние ТМ на процессы массового развития микроводорослей и образование ими вторичных метаболитов, в том числе токсинов и одорантов [14, 32, 36]. Известно, что железо оказывает стимулирующее действие на рост цианобактерий и влияет на синтез цианотоксинов [23, 24]. Для оптимального роста и токсинообразования *Microcystis aeruginosa* необходим цинк, в то время как медь, никель и ряд других металлов в нетоксичных для роста концентрациях не оказывают влияния на образование токсина [23]. В высоких концентрациях все тяжелые металлы, включая и те, которые необходимы для роста клеток (например, медь, цинк и др.), оказывают токсическое действие на цианобактерии [31]. В различных исследованиях пороговые концентрации металлов по отношению к цианобактериям отличаются на порядки, что затрудняет оценку устойчивости тех или иных видов в условиях антропогенного воздействия [1, 9].

Исследования, касающиеся влияния металлов на образование одорирующих веществ, весьма ограничены и, как правило, рассматривают только два метаболита — геосмин и 2-метилизоборнеол [9]. Известно, что концентрация геосмина увеличивается в случае недостатка в среде железа [16], но снижается в присутствии меди [32]. Ограниченность данных, характеризующих действие стрессовых факторов, в том числе ТМ, на образование вторичных метаболитов массовыми видами водорослей, предопределяет необходимость дальнейших исследований в этой области [4, 16].

Целью настоящей работы являлось исследование влияния меди, никеля и цинка на рост, фотосинтетическую активность и синтез вторичных метаболитов основных возбудителей «цветения» воды — цианобактерий *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii*, *Anabaena variabilis* и *Aphanizomenon flos-aquae*.

Материал и методика исследований. В качестве тест-объектов использовали альгологически чистые культуры *Microcystis aeruginosa* Kütz. (CALU 973), *Oscillatoria agardhii* Gom. (CALU 1113), *Anabaena variabilis* Kütz. (CALU 458) и *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs (CALU 1033) из коллекции Биологического института СПбГУ (Россия). Культивирование цианобактерий проводили на среде BG₁₁ [37] в колбах Эрленмейера при температуре 20 ± 2°C, освещенности 4500—5000 лк и световом режиме свет — темнота 12 : 12.

Медь добавляли в среду в концентрации 0,004—1,5 мг/л в виде CuSO₄×5H₂O, цинк — в концентрации 0,025—4,5 мг/л в виде ZnSO₄×7H₂O, никель — в концентрации 0,025—2,0 мг/л в виде NiSO₄×7H₂O.

Рост цианобактерий контролировали по сухой массе. Микроскопические наблюдения цианобактерий проводили на световом микроскопе Leica DM2000 (Германия). Измерение клеток и статистическую обработку данных проводили в программе ВидеоТест-Размер 5.0 (www.videotest.ru).

Контроль пигментного комплекса цианобактерий осуществляли по изменению содержания хлорофилла *a*, каротиноидов, феопигментов и фикобилипротеинов, которое определяли по оптической плотности характерных полос поглощения на спектрофотометре Genesys 10uv scanning (Thermo Spectronic, США). Экстракцию хлорофилла *a*, каротиноидов и феопигментов проводили 90%-ным ацетоном при 4°C в течение 24 ч. Концентрацию хлорофилла *a* рассчитывали по формуле Джеффри и Хамфри [15], содержание продуктов распада хлорофилла *a* (феопигментов) рассчитывали по уравнениям Лоренцена [21], каротиноидов — по уравнению, предложенному Парсонсом и Стриклендом [29]. Фикобилипротеины — фикоцианин, аллофикоцианин и фикоэритрин экстрагировали фосфатным буфером с применением 6-кратного замораживания. Концентрацию фикобилипротеинов рассчитывали по формулам Сигелмана и Кайси [34].

Содержание белка определяли методом Лоури [22]. Содержание экзополисахаридов определяли колориметрически с использованием метода восстановления ТТХ [2]. Кислотный гидролиз полисахаридов проводили 10н. H₂SO₄, реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 3 ч.

Наличие и содержание в среде одорирующих веществ определяли с помощью хромато-масс-спектрометра GC-MS QP-2010 (Shimadzu, Япония) методом равновесной паровой фазы в режиме полного сканирования. Параметры анализа: капиллярная колонка SPB-5 средней полярности (60 м × 0,2 мм, толщина фазы — 0,2 мкм), объем вводимой пробы равновесного пара 1 мл, температура инкубирования пробы 105°C, время инкубирования 45 мин, температура инжектора 270°C, температура интерфейса 250°C. Температура колонки была запрограммирована от начальной 50°C до конечной 250°C (при скорости 3°C/мин — от 75 до 150°C, и 10°C/мин — от 150 до 250°C). Интенсивность запаха определяли органолептическим методом [40].

Микроцистин-LR из клеток цианобактерий экстрагировали метанолом [20]. Концентрацию микроцистина-LR определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Hewlett-Packard HP1090 с диодно-матричным детектором (длина волны 238 нм, разрешение 1,2 нм). Условия хроматографирования: колонка Luna фирмы Phenomenex, температура 35°C, скорость потока 1 мл/мин, детекция 215 нм, элюент 30%-ный ацетонитрил (растворитель А) и 50%-ный ацетонитрил (растворитель Б), подкисленные 0,1%-ной ТХУ, объем пробы 0,2 мл. Стандартный раствор микроцистина-LR был получен от Alexis Corporation (Lausen, Швейцария).

В качестве основных токсикологических параметров использовали NOEC — наиболее высокую концентрацию токсиканта, при которой не наблюдался статистически значимый ингибирующий эффект ($p < 0,05$), и EC₅₀ — концентрацию токсиканта, вызывающую 50%-ное ингибирование роста цианобактерий. Токсикологические параметры рассчитывали методом нелинейной регрессии [25]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета компьютерных программ Statistica 6.0 (StatSoft).

Результаты исследований и их обсуждение

Ингибирующее действие меди, никеля и цинка на рост и биохимическую активность исследованных цианобактерий проявлялось в диапазоне концентраций 10^{-7} — 10^{-5} моль/л и выше, в зависимости от металла и вида микроорганизмов.

Наибольшую чувствительность к действию тяжелых металлов проявили *M. aeruginosa* и *O. agardhii* (табл. 1). Статистически значимый эффект от действия металлов на цианобактерии наблюдался при концентрации меди, превышающей 6—7 мкг/л, никеля — 50—85, цинка — 125—140 мкг/л. Таким образом, хотя никель в концентрации, соответствующей ПДК (0,02 мг/л), не оказывал ингибирующего действия на цианобактерии, медь и цинк ингибировали развитие *M. aeruginosa* и *O. agardhii* даже при концентрации значительно ниже ПДК (1,0 мг/л).

Более высокую устойчивость к загрязнению воды ТМ проявили цианобактерии *An. variabilis* и *A. flos-aquae*. Концентрации никеля и цинка, в два и более раз превышающие ПДК, не оказывали заметного токсического эффекта на рост этих цианобактерий. Значительное альгицидное действие меди на *An. variabilis* проявлялось при концентрации, составляющей 0,6 ПДК, цинка — превышающей ПДК в 3 раза. Необходимо отметить высокую устойчивость данной культуры к никелю. EC_{50} никеля для *An. variabilis* составляет 1840 мкг/л, что почти в 100 раз выше ПДК. Несколько меньший, но аналогичный эффект был отмечен при действии исследованных металлов на *A. flos-aquae*.

Различным образом проявлялось действие не ингибирующих рост концентраций меди, никеля и цинка (< NOEC) на развитие цианобактерий. Известно, что некоторые ТМ, например марганец и железо, в малых концентрациях стимулируют рост и развитие микроводорослей [1, 39]. Из исследованных металлов стимулирующее действие на рост *A. flos-aquae* и *An. variabilis* оказывала медь в концентрации соответственно 25—50 и 100—200 мкг/л (рис. 1). Никель в концентрации < NOEC не оказывал влияния на цианобактерии. Цинк стимулировал развитие *A. flos-aquae* в концентрации от 100 до 300 мкг/л.

В небольших концентрациях (25—100 мкг/л), характерных для многих природных водоемов, цинк оказывал стимулирующее действие на рост *M. aeruginosa* (рис. 2, а). Стимуляция роста *M. aeruginosa* сопровождалась накоплением в среде повышенного количества токсина микроцистина-LR (рис. 2, б).

Многие исследователи указывают, что цианобактерии продуцируют максимальное количество токсинов при условиях, наиболее благоприятных для роста [35]. В том числе, цинк в небольших концентрациях может способствовать не только росту, но и токсинообразованию *M. aeruginosa* [23]. Однако наши исследования не выявили различий между количеством токсина на единицу биомассы *M. aeruginosa* в загрязненной и незагрязненной цинком среде (рис. 2, в). Повышенное накопление в среде токсина в присутст-

1. Параметры токсичности тяжелых металлов (мкг/л)

Культура	Медь		Никель		Цинк	
	NOEC	EC ₅₀	NOEC	EC ₅₀	NOEC	EC ₅₀
<i>Microcystis aeruginosa</i>	7 ± 1	25 ± 2	85 ± 6	165 ± 10	140 ± 8	230 ± 15
<i>Anabaena variabilis</i>	250 ± 16	600 ± 35	1200 ± 74	1840 ± 140	2520 ± 175	3400 ± 210
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	300 ± 18	580 ± 30	300 ± 22	450 ± 25	2300 ± 140	2840 ± 160
<i>Oscillatoria agardhii</i>	6 ± 1	23 ± 3	50 ± 4	100 ± 8	125 ± 9	200 ± 12

вии цинка связано со стимуляцией роста и увеличением биомассы цианобактерий.

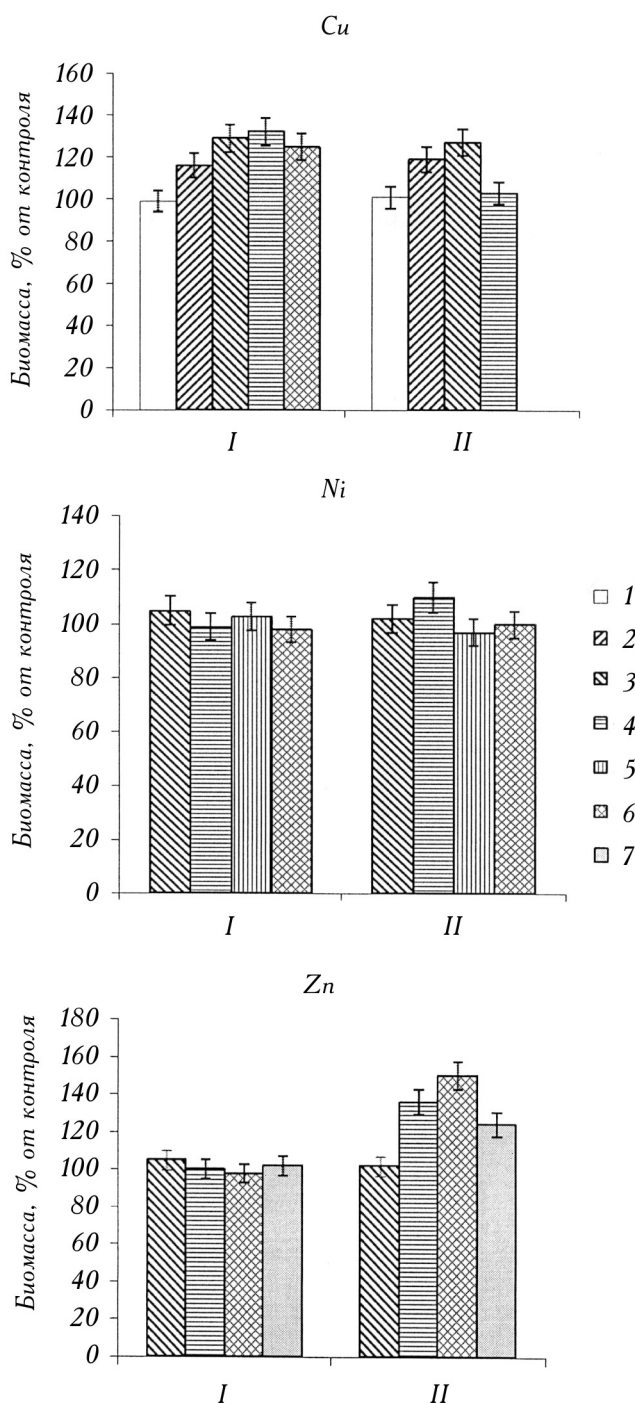
Под действием подавляющих рост концентраций ТМ, в том числе цинка, происходит ингибирование токсинообразования и, как следствие, снижение содержания токсина в среде. По сравнению с влиянием на процессы роста, ингибирующее действие металлов на синтез токсинов проявлялось в меньшей степени. Так, концентрации никеля и цинка, ингибирующие рост *M. aeruginosa* на 20—25%, не оказывали влияния на продуктивность культуры по токсину. Таким образом, по сравнению с ростом клеток, процесс образования микроцистина-LR более устойчив к действию ТМ.

Токсическое действие ТМ на цианобактерии сопровождалось морфологическими изменениями в клетках. Под действием ТМ происходила деформация клеток, увеличение их размеров, распад нитей на фрагменты и отдельные клетки (рис. 3, табл. 2).

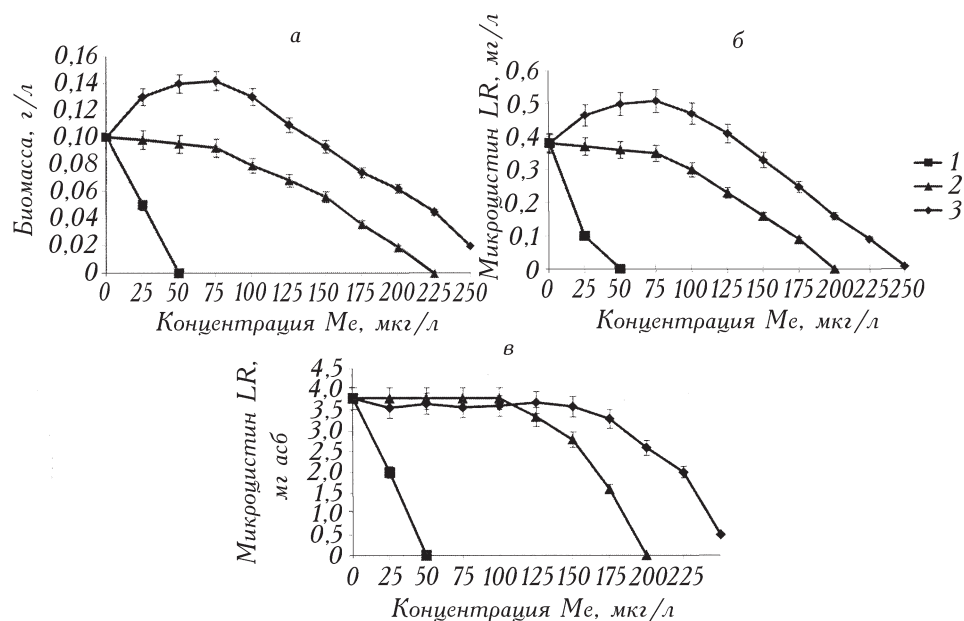
В присутствии меди, никеля и цинка заметно уменьшалась длина трихомов нитчатых цианобактерий *A. flos-aquae* и *An. variabilis*, вплоть до распада на отдельные клетки. В наибольшей степени эти морфологические изменения наблюдались при действии никеля. Гетероцисты увеличивались в ширину, некоторые отделялись от трихомов. За счет увеличения ширины происходило увеличение размеров вегетативных клеток цианобактерий *A. flos-aquae* и *An. variabilis*, при этом длина клеток практически не изменялась (см. табл. 2). Увеличение ширины клеток в присутствии никеля сопровождалось уменьшением соотношения длина : диаметр (l/d), причем в деформированных клетках *An. variabilis* этот показатель был меньше единицы, то есть ширина превышала длину. Объем деформированных клеток увеличивался в 1,5—2 раза. Увеличение размеров клеток под действием тяжелых металлов связано с подавлением клеточного деления, то есть разобщением процессов роста и деления [13]. Аналогичная деформация клеток была выявлена у культур *M. aeruginosa* и *O. agardhii* (данные не представлены). Однако, в отличие от других нитчатых цианобактерий, у *O. agardhii* не наблюдалось распада нитей на отдельные фрагменты и клетки.

Тяжелые металлы оказывали влияние на разные стороны метаболизма цианобактерий. У исследованных культур обнаружена различная чувствительность пигментного аппарата к действию ТМ. У культуры *An. variabilis* в присутствии ТМ в концентрациях, подавляющих рост на 50%, наблюдалось ингибирование образования основного фотосинтетического пигмента хлорофилла *a* в пределах 10—20% (табл. 3). У культуры *M. aeruginosa* содержание хлорофилла *a* в клетках снижалось под действием никеля и цинка, но практически не изменялось в присутствии меди.

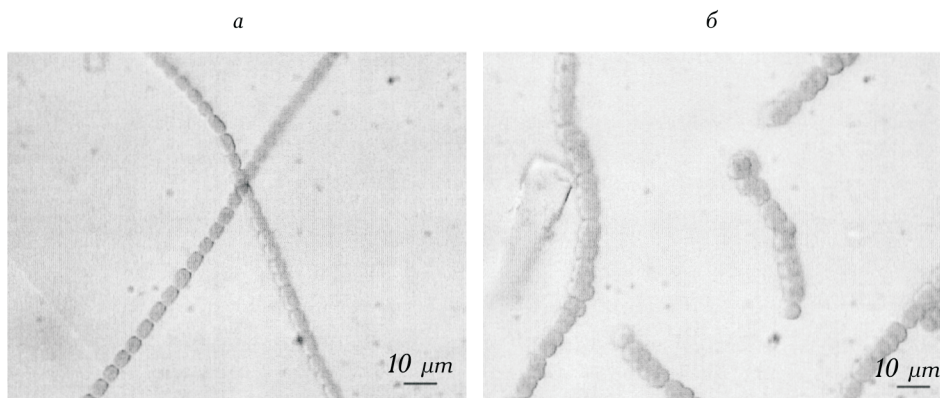
Наиболее значительный ингибирующий эффект ТМ на образование хлорофилла *a* — до 43% — отмечен у *A. flos-aquae*. Корреляционный анализ выявил обратную зависимость между образованием хлорофилла *a* и концентрацией металлов ($r^2 = 0,92—0,96$). Снижение содержания хлорофилла *a* сопровождалось увеличением количества продуктов деградации хлорофил-



1. Влияние меди, никеля и цинка на рост *Aphanizomenon flos-aquae* и *Anabaena variabilis*. Концентрация металла: 1 — 5 мкг/л; 2 — 25 мкг/л; 3 — 50 мкг/л; 4 — 100 мкг/л; 5 — 150 мкг/л; 6 — 200 мкг/л; 7 — 300 мкг/л.



2. Влияние меди (1), никеля (2) и цинка (3) на рост (а), накопление в среде токсина микроцистина-LR (б) и продуктивность по токсину (в) культуры *Microcystis aeruginosa*.



3. Морфологические изменения *Anabaena variabilis* под влиянием никеля: а — среда BG₁₁; б — среда BG₁₁ с Ni.

ла — феопигментов у всех исследованных культур.

ТМ практически не влияли на образование фикобилипротеинов *M. aeruginosa*, тогда как оказывали ингибирующее действие на синтез фикобилипротеинов культурами *An. variabilis* и *A. flos-aquae*. Однако снижение суммарного количества фикобилипротеинов под действием ТМ в большинстве случаев было незначительным, что указывает на несколько большую устойчивость пигментов данной группы, по сравнению с хлорофиллом *a*. Наиболь-

2. Влияние никеля на размер клеток *Anabaena variabilis* и *Aphanizomenon flos-aquae*

Параметры	<i>Anabaena variabilis</i>		<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	
	контроль	Ni	контроль	Ni
Диаметр клетки (<i>d</i>), мкм	3,7 ± 0,4	5,4 ± 0,3	4,6 ± 0,1	5,9 ± 0,4
Длина клетки (<i>l</i>), мкм	4,8 ± 0,4	4,5 ± 0,2	6,5 ± 0,5	6,2 ± 0,6
<i>l/d</i>	1,29 ± 0,08	0,82 ± 0,06	1,41 ± 0,07	1,05 ± 0,04
Объем клетки, мкм ³	51,6 ± 3,2	103,1 ± 7,0	108,0 ± 4,8	169,5 ± 12,1

шее снижение продуктивности по фикобилипротеинам (на 60%) наблюдалось у *An. variabilis* в присутствии цинка.

В то же время, ТМ оказывали стимулирующее действие на синтез хлорофилла *a* и фикобилипротеинов культурой *O. agardhii*. У данной культуры обнаружена достоверная обратная зависимость содержания зеленых и синих пигментов от биомассы в присутствии металлов ($r^2 = 0,90$). Обратный характер связи показывает, что снижение биомассы цианобактерий под действием ТМ не приводит к пропорциональному снижению концентрации пигментов.

Аналогичный характер действия металлов был выявлен при изучении влияния меди на некоторые диатомовые водоросли [5, 38]. Несмотря на отчетливо выраженный эффект торможения клеточного роста, ингибирующие концентрации меди не оказывают влияния на содержание фотосинтетических пигментов у *Phaeodactylum tricornutum* [5]. У морских диатомовых водорослей *Nitzschia closterium* соединения меди стимулировали процесс образования хлорофилла *a* [38]. Повышенный синтез пигментов может быть связан с проявлением защитной реакции клетки на действие токсиканта и указывает на наличие у водорослей механизма адаптации к данным металлам [17, 18]. Под действием ТМ в клетках цианобактерий происходят компенсаторно-адаптивные изменения фотосинтетической системы, направленные на сохранение их жизнеспособности.

Сравнивая токсическое действие металлов в концентрациях, соответствующих ЕС₅₀, на процесс образования хлорофилла *a*, их можно расположить в следующем порядке, общем для всех исследованных культур: Ni > Zn > Cu.

В ином порядке проявляется токсическое действие металлов на рост цианобактерий: Cu > Ni > Zn. Обратный характер зависимости предполагает различную чувствительность процессов роста и фотосинтеза к действию ТМ. Полученные результаты находятся в соответствии с литературными данными [14] о том, что для синтеза хлорофилла *a* культурой *M. aeruginosa* LE3 цинк более токсичен, чем медь, в то время как для роста наблюдается обратная зависимость.

3. Влияние тяжелых металлов на фотосинтетическую активность цианобактерий

Me*	Хлорофилл <i>a</i> , мг/г абс. су- хой биомассы	Феопитин, мг/г абс. су- хой биомассы	Каротиноиды, мг/г абс. су- хой биомассы	Фикобили- протеины, мг/г абс. су- хой биомассы	Пигментный индекс
<i>Oscillatoria agardhii</i>					
Контроль	5,91 ± 0,36	1,20 ± 0,09	1,34 ± 0,08	10,27 ± 0,78	0,23 ± 0,02
Cu	8,92 ± 0,54	1,46 ± 0,14	1,51 ± 0,09	16,33 ± 1,34	0,17 ± 0,01
Ni	7,46 ± 0,41	1,72 ± 0,19	1,43 ± 0,11	15,10 ± 1,06	0,19 ± 0,01
Zn	8,34 ± 0,68	1,58 ± 0,09	1,09 ± 0,10	15,86 ± 0,93	0,13 ± 0,03
<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Контроль	24,35 ± 1,76	1,16 ± 0,09	3,31 ± 0,24	27,34 ± 1,98	0,13 ± 0,01
Cu	23,60 ± 1,54	1,34 ± 0,10	6,39 ± 0,42	28,51 ± 2,02	0,27 ± 0,02
Ni	19,27 ± 1,20	1,70 ± 0,12	6,52 ± 0,54	26,12 ± 1,57	0,33 ± 0,03
Zn	21,82 ± 1,31	3,62 ± 0,21	7,28 ± 0,39	27,93 ± 1,49	0,33 ± 0,03
<i>Anabaena variabilis</i>					
Контроль	29,51 ± 1,92	7,5 ± 0,46	0,75 ± 0,06	49,52 ± 3,41	0,03 ± 0,02
Cu	26,53 ± 1,30	10,6 ± 0,59	1,97 ± 0,12	42,09 ± 2,90	0,07 ± 0,04
Ni	24,10 ± 1,87	9,8 ± 0,34	1,80 ± 0,19	43,08 ± 2,64	0,08 ± 0,05
Zn	25,04 ± 1,31	9,5 ± 0,61	1,82 ± 0,24	19,81 ± 1,42	0,07 ± 0,03
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>					
Контроль	21,36 ± 1,12	0,58 ± 0,04	0,51 ± 0,03	32,34 ± 2,06	0,02 ± 0,01
Cu	18,32 ± 1,30	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,06	28,78 ± 1,93	0,05 ± 0,03
Ni	12,23 ± 0,97	2,20 ± 1,37	0,83 ± 0,03	26,84 ± 1,71	0,07 ± 0,05
Zn	15,70 ± 0,88	1,18 ± 0,45	0,80 ± 0,09	32,15 ± 2,24	0,05 ± 0,02

* Концентрация ТМ, соответствующая ЕС₅₀.

По сравнению с синтезом хлорофилла *a*, процесс образования желтых пигментов — каротиноидов — менее чувствителен к действию ТМ (см. табл. 2). Содержание каротиноидов в клетках цианобактерий в присутствии тяжелых металлов не изменялось (*O. agardhii*) или увеличивалось в 1,5—2,5 раза (*M. aeruginosa*, *An. variabilis*, *A. flos-aquae*). Повышенный синтез каротиноидов, очевидно, связан с их защитной функцией в условиях окислительного стресса [28]. Между содержанием каротиноидов и концентрацией ТМ для культур *M. aeruginosa*, *An. variabilis* и *A. flos-aquae* была выявлена прямая положительная корреляция ($r^2 = 0,84—0,92$).

Соотношение суммы каротиноидов и хлорофилла *a* (пигментный индекс) является одной из характеристик физиологического состояния клеток. Под действием ТМ у большинства культур этот показатель увеличивался в два и более раза (см. табл. 3). Повышение пигментного индекса в присутствии тяжелых металлов свидетельствует об угнетенном состоянии и снижении функциональной активности цианобактерий [3, 6]. Исключение, в силу стимулирующего действия металлов на синтез хлорофилла *a*, составляет культура *O. agardhii*.

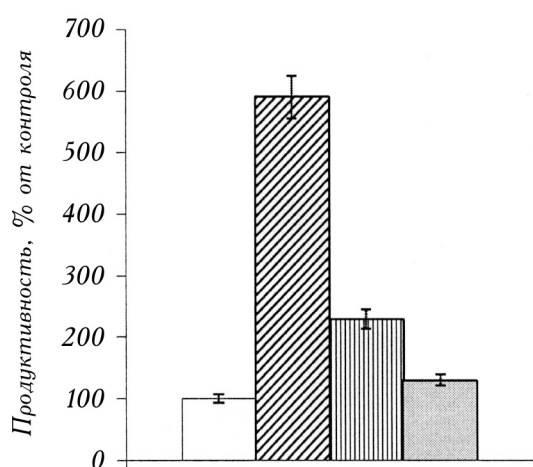
Ингибирование роста цианобактерий в присутствии ТМ сопровождалось образованием и выделением в среду значительного количества внеклеточных органических веществ, имеющих немаловажное значение для формирования качества воды, таких как белки и полисахариды (рис. 4, 5).

Так, наибольшее количество белка — до 5,48 мг в расчете на 1 г абсолютно сухой биомассы, или 580% по сравнению с контролем, было определено в нативном растворе культуры *M. aeruginosa* в присутствии меди в концентрации, соответствующей EC_{50} . Аналогичным образом исследованные металлы действовали на экскрецию белков нитчатými цианобактериями *O. agardhii*, *An. variabilis* и *A. flos-aquae*.

Увеличение количества выделяемого в среду белка может быть связано как с постлетальным распадом клеток, так и с повышенным синтезом металлоионен-подобных белков, участвующих в хелатировании токсичных ионов металлов [33]. Выделение в среду различных органических соединений, образующих комплексы с ТМ, служит защитным механизмом у водорослей [7].

Известно, что действие неблагоприятных факторов сопровождается усилением синтеза внеклеточных полисахаридов [26, 27]. При негативном воздействии ТМ, как и многих других токсических веществ, экзополисахариды играют важную роль в их связывании и успешном функционировании клеток цианобактерий. Удельное содержание полисахаридов, выделяемых цианобактериями *M. aeruginosa*, *An. variabilis*, *O. agardhii* и *A. flos-aquae*, в присутствии меди возросло в 2—3,5 раза, никеля — в 2—3,7, цинка — в 2—2,7 раза (рис. 5—7).

Количество образуемых полисахаридов зависело от вида цианобактерий и внесенного токсиканта, но для всех культур увеличивалось с увеличением концентрации металла. Максимальное количество полисахаридов — 0,25 г



4. Влияние тяжелых металлов на выделение в среду внеклеточных белков культурой *Microcystis aeruginosa*: 1 — контроль; 2 — Cu; 3 — Ni; 4 — Zn.

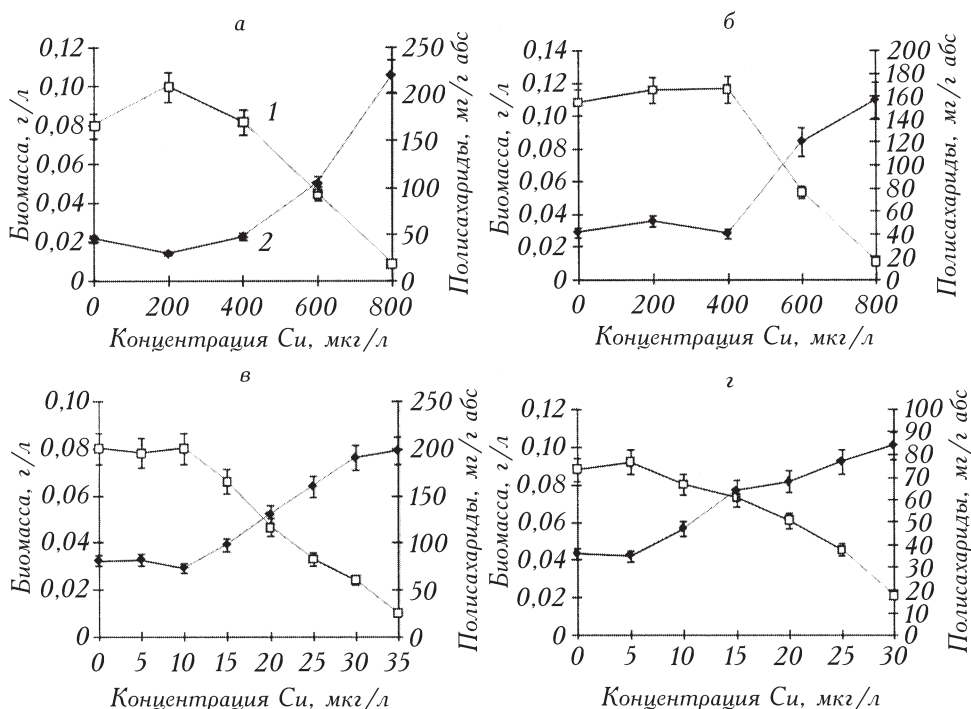
глюкозных единиц в расчете на 1 г сухой биомассы — было образовано культурой *M. aeruginosa* под действием цинка. В концентрациях, не влияющих на рост цианобактерий, медь, никель и цинк не оказывали влияния на синтез полисахаридов. Под действием ингибирующих концентраций исследованных металлов происходил активный синтез полисахаридов клетками цианобактерий и их выделение во внешнюю среду.

Повышенное содержание полисахаридов, как и белков, является негативным фактором, влияющим на формирование качества воды в водоемах [4, 8]. Полисахариды и белки представляют собой субстрат для развития бактерий, грибов и актиномицетов, увеличение их концентрации приводит к биологическому и химическому загрязнению воды за счет клеток микроорганизмов и их метаболитов. Макромолекулярные карбоксиполисахариды водорослей снижают эффективность флокуляции примесей при очистке воды и задерживают удаление из нее низкомолекулярных метаболитов, что существенно удорожает водоподготовку и ухудшает качество получаемой воды [8].

Среди разнообразных метаболитов цианобактерий немаловажное значение для качества воды имеют летучие соединения, обладающие сильным запахом: амины, меркаптаны, диметилдисульфид, геосмин, 2-метилизоборнеол, бета-циклоцитраль, 2,4-гептадиенал и др. Из исследованных культур способность к образованию одорантов была выявлена у *O. agardhii*. Пороговое число запаха (N) для *O. agardhii* составило 12, что указывает на активный синтез одорирующих веществ. В присутствии ТМ образование одорирующих веществ усиливалось (табл. 4).

Под действием никеля и цинка в концентрациях, соответствующих или превышающих EC_{50} , пороговое число запаха увеличилось вдвое. Наиболее значительное повышение интенсивности запаха было выявлено под действием меди. Пороговое число запаха изменялось от 12 баллов в контроле до 100—140 в среде, содержащей ионы меди. Интенсивность запаха усиливалась с увеличением концентрации токсиканта.

Хромато-масс-спектрометрический анализ состава одорирующих веществ *O. agardhii* показал, что основным компонентом смеси является бен-



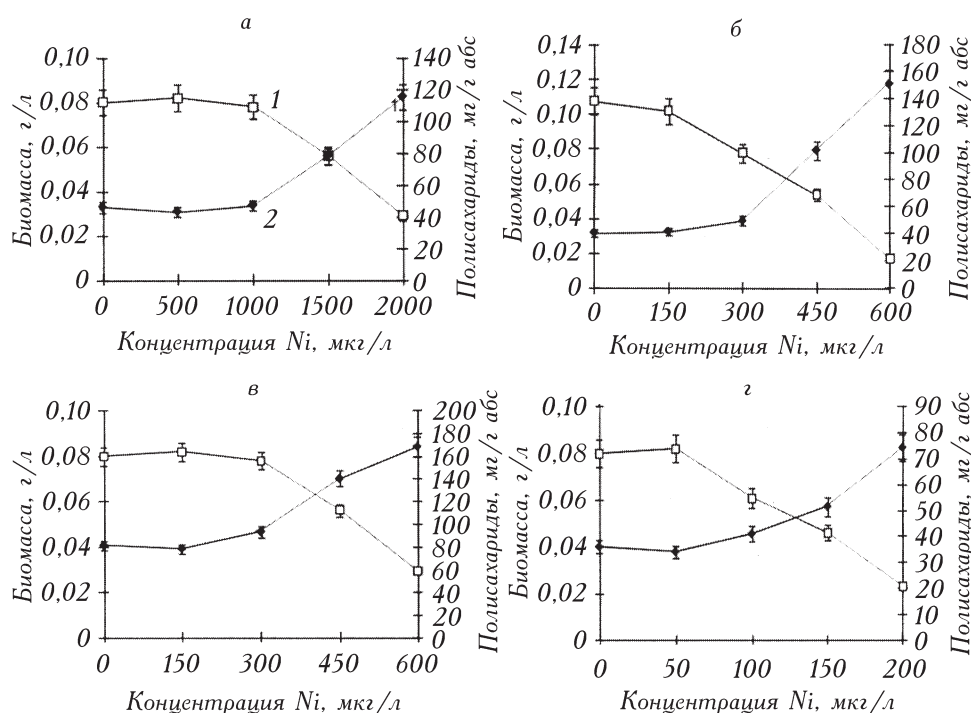
5. Влияние меди на синтез внеклеточных полисахаридов цианобактериями. Здесь и на рис. 6, 7: а — *Anabaena variabilis*, б — *Aphanizomenon flos-aquae*, в — *Microcystis aeruginosa* и г — *Oscillatoria agardhii*; 1 — биомасса, г/л; 2 — экзополисахариды, мг глюкоз. ед/г абс. сухой биомассы (абс).

зотиазол. В присутствии меди концентрация бензотиазола в культуральной жидкости достигала очень высоких значений — до 3 мг/л. Известно, что к синтезу бензотиазола способны некоторые стрептомицеты и бактерии [11, 12], в том числе цианобактерия *O. perornata* [41]. Бензотиазол является сильным одорантом, придающим воде неприятный запах. Увеличение концентрации бензотиазола в присутствии ТМ, особенно меди, по-видимому, является основной причиной усиления запаха культуральной жидкости *O. agardhii*. Накопление в среде бензотиазола может происходить как в результате прямого выделения клетками, так и вследствие поступления в среду продуктов распада отмерших клеток.

Заключение

Цианобактерии относятся к числу основных возбудителей «цветения» воды и, в силу своего доминирующего положения в природных биоценозах, фактически определяют качество воды в водоемах. Массовое развитие цианобактерий является одним из наиболее важных последствий антропогенного воздействия, в частности загрязнения воды биогенными элементами, органическими соединениями и ТМ.

Тяжелые металлы обладают многогранным действием на цианобактерии. В диапазоне концентраций 10^{-7} — 10^{-5} М они могут одновременно полностью по-



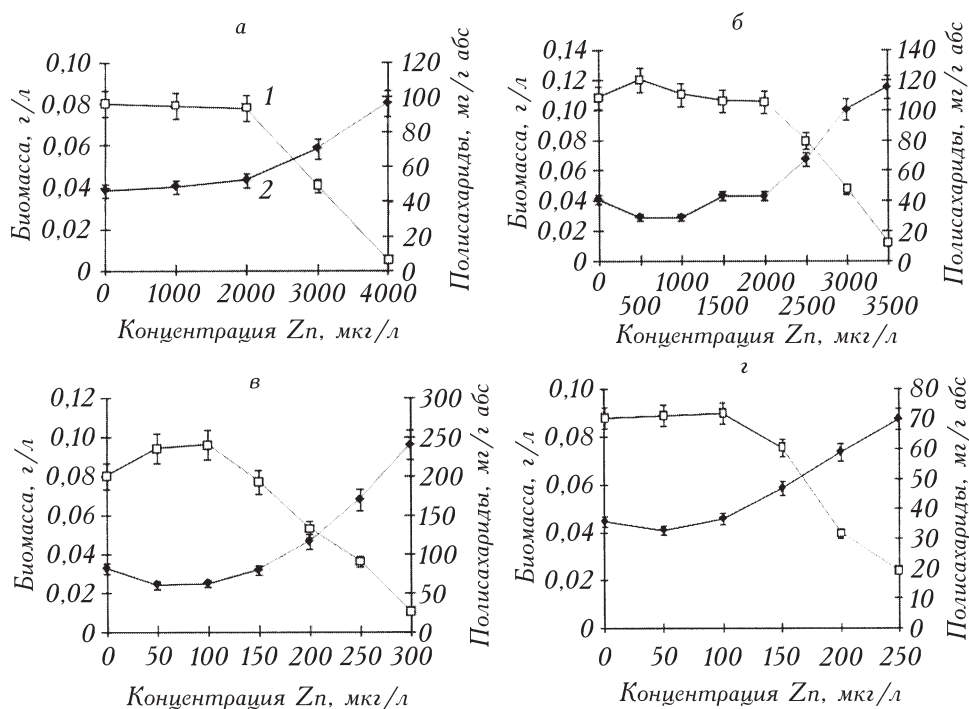
6. Влияние никеля на синтез внеклеточных полисахаридов цианобактериями.

4. Влияние меди, никеля и цинка на образование одорирующих веществ *Oscillatoria agardhii*

Металлы	Концентрация, мкг/л	Биомасса, % от контроля	Порог восприятия запаха (N), баллы
Контроль	—	100	12
Cu	10	72	100
	30	37	140
Ni	75	67	12
	115	35	24
Zn	150	67	12
	200	50	24

давливать развитие одних цианобактерий, ингибировать рост других и стимулировать развитие третьих. К числу наиболее чувствительных к воздействию ТМ культур относятся *M. aeruginosa* и *O. agardhii*, наиболее устойчивых — *An. variabilis* и *A. flos-aquae*.

Токсичные штаммы цианобактерий, в случае стимуляции роста низкими концентрациями тяжелых металлов, накапливают в среде повышенное количество



7. Влияние цинка на синтез внеклеточных полисахаридов цианобактериями.

цианотоксинов. В присутствии ТМ усиливается образование одорирующих веществ цианобактериями, продуктами метаболизма которых являются соединения-одоранты.

Процессы взаимодействия цианобактерий с ТМ сопровождаются различными функциональными реакциями, определяющими развитие компенсаторно-адаптивных изменений, направленных на сохранение жизнеспособности клеток. Адаптация цианобактерий к ТМ осуществляется благодаря изменениям фотосинтетической системы и повышенному синтезу различных органических соединений, образующих комплексы с тяжелыми металлами, в том числе белков и полисахаридов. Полисахариды и белки являются причиной биологического и химического загрязнения воды, снижают эффективность ее очистки и существенно ухудшают качество.

Регуляторное влияние ТМ на альгоценозы может проявляться в сукцессии цианобактерий в водных экосистемах, развитии массовых видов и возникновении «цветения» воды. К серьезным негативным последствиям загрязнения ТМ относится повышенный синтез цианобактериями метаболитов, в том числе одорантов и токсинов, вызывающих значительное ухудшение качества воды в водоемах.

**

Досліджено вплив міді, нікелю і цинку на ріст, фотосинтетичну активність і синтез вторинних метаболітів основних збудників «цвітіння» води — цианобактерій

Microcystis aeruginosa, *Oscillatoria agardhii*, *Anabaena variabilis* і *Aphanizomenon flos-aquae*. Показано, що в діапазоні концентрацій 10^{-7} — 10^{-5} М важкі метали можуть не тільки одночасно повністю пригнічувати розвиток одних ціанобактерій та ріст інших, але і стимулювати виділення в середовище різних метаболітів. Стимуляція росту токсигенної культури спричиняла накопичення в середовищі підвищеної кількості гепатотоксину мікроцистину LR. У культурі, продуктами метаболізму якої є сполуки-одоранти, під впливом пригнічуючих концентрацій важких металів посилювалось утворення одоруючих сполук. Спільним ефектом пригнічуючої дії важких металів було виділення в середовище значної кількості білків і позаклітинних високомолекулярних полісахаридів. Підвищене виділення екзометаболітів, в тому числі токсичних, негативно впливає на формування якості води у водоймищах. Регуляторний вплив важких металів на альгоценози може проявлятися в суцесії ціанобактерій у водних екосистемах.

**

The effect of copper, nickel and zinc on growth, photosynthesis and secondary metabolites production by bloom-forming cyanobacteria Microcystis aeruginosa, Oscillatoria agardhii, Anabaena variabilis u Aphanizomenon flos-aquae was investigated. At concentration range 10^{-7} — 10^{-5} mol/L heavy metals can eliminate some cyanobacteria, inhibit the growth of others and stimulate still others. The stimulation of growth of Microcystis aeruginosa contributed the enhanced toxin (Microcystin LR) concentration. Heavy metals enhanced synthesis of odorous secondary metabolites by off-flavor compounds producer Oscillatoria agardhii. The common effect of heavy metals on cyanobacteria was the excretion of significant quantity of proteins and exopolysaccharides. The results reveal that the presence of heavy metals could induce the cyanobacterial succession and lead to water quality impairment due to the enhanced metabolites production.

**

1. Брагинский Л.П., Величко И.М., Щербань Э.П. Пресноводный планктон в токсической среде. — Киев: Наук. думка, 1987. — 179 с.
2. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. — 307 с.
3. Курейшевич А.В., Сиренко Л.А., Мегведь В.А. Многолетняя динамика содержания хлорофилла а и особенности развития фитопланктона в Днепро-родзержинском водохранилище // Гидробиол. журн. — 1999. — Т. 35, № 2. — С. 49—62.
4. Курейшевич А.В., Гусейнова В.П., Сакевич А.И. Влияние метаболитов водорослей на качество воды в условиях действия природных и антропогенных факторов // Там же. — 2003. — Т. 39, № 6. — С. 57—72.
5. Маркина Ж.В., Айзгайчер Н.А. Содержание фотосинтетических пигментов, рост и размер клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricorutum* при загрязнении среды медью // Физиология растений. — 2006. — Т. 53, № 3. — С. 343—347.
6. Минеева Н.М. Растительные пигменты в воде Волжских водохранилищ. — М: Наука, 2004. — 156 с.
7. Сенцова О.Ю., Максимов В.Н. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы // Успехи микробиол. — 1985. — Т. 20. — С. 227—252.
8. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. — Киев: Наук. думка, 1988. — 256 с.

9. *Baptista M.S., Vasconcelos M.T.* Cyanobacteria metal interactions: requirements, toxicity, and ecological implications // *Crit. Rev. Microbiol.* — 2006. — Vol. 32, N 3. — P. 127—137.
10. *Codd G.A., Lindsay J., Young F.M. et al.* From mass mortalities to management measures // *Harmful Cyanobacteria.* — Netherlands: Springer, 2005. — P. 1—25.
11. *Dickschat J. S., Martens T., Brinkhoff T. et al.* Volatiles Released by a *Streptomyces sp.* isolated from the North Sea // *Chem. Biodiv.* — 2005. — Vol. 2. — P. 837—865.
12. *Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A.S., Savchuk, S.* Identification and use of potential bacterial organic volatiles in biological control // *Soil Biol. Biochem.* — 2005. — Vol. 37. — P. 955—964.
13. *Fisher N.S., Jones G.J., Nelson D.M.* Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve) 1 // *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.* — 1981. — Vol. 51, N 1. — P. 37—56/
14. *Gouvea S.P., Boyer G.L., Twiss M.R.* Influence of ultraviolet radiation, copper, and zinc on microcystin content in *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) // *Harmful Algae.* — 2008. — Vol. 7. — P. 194—205.
15. *Jeffrey S.W., Humphrÿ G.E.* New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in higher plants, algae and natural phytoplankton // *Biochim. and Physiol. Pflanz. Bd.* — 1975. — Vol. 167, N 2. — P. 191—194.
16. *Juttner F, Watson S. B.* Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Waters // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73, N 14. — P. 4935—4406.
17. *Kiran B., Kaushik A., Kaushik C.P.* Metal-salt co-tolerance and metal removal by indigenous cyanobacterial strains // *Process Biochemistry.* — 2008. — Vol. 43, N 6. — P. 598—604.
18. *Kobbia I.A., Shabana E.F., Khalil Z., Zaki F.T.* Growth criteria of two common cyanobacteria isolated from Egyptian flooded soil, as influenced by some pesticides // *Water, Air, and Soil. Pollut.* — 1991. — Vol. 60. — P. 1573—2932.
19. *Landsberg J.H.* The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms // *Reviews in Fish. Sci.* — 2002. — Vol. 10, N 2. — P. 113—390.
20. *Lawton L.A., Edwards C., Codd G.A.* Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters // *Analyst.* — 1994. — Vol. 119. — P. 1525—1530.
21. *Lorenzen G.J.* Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations // *Limnology and Oceanography.* — 1967. — Vol. 2. — P. 343—346.
22. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
23. *Lukac M., Aegerter R.* Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa* // *Toxicon.* — 1993. — Vol. 31. — P. 293—305.

24. Lyck S., Gjolme N., Utkilen H. Iron-starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 22/1 (Chroococcales, Cyanophyceae) // *Phycologia*. — 1996. — Vol. 35, N 6. — P. 120—124.
25. Nyholm N., Sørensen B.S., Kusk K.O. Statistical treatment of data from microbial toxicity tests // *Environ. Toxicol. Chem.* — 1992. — Vol. 11. — P. 157—167.
26. Otero A., Vincenzini M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity // *J. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 102. — P. 143—152.
27. Ozturk S, Aslim B. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress // *Environ. Sci. Pollut. Res.* — 2010. — Vol. 17, N 3. — P. 595—602.
28. Paerl H.W., Tucker J., Bland P.T. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms // *Limnol. Oceanogr.* — 1983. — Vol. 28, N 5. — P. 847—857.
29. Parsons T.R., Strickland J.D.H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotinoides // *J. Mar. Res.* — 1963. — Vol. 21. — P. 155—163.
30. Pflugmacher S., Wiegand C. Metabolism of microcystin-LR in aquatic organisms // *Cyanotoxins*. — Berlin: Springer, 2001. — P. 257—260.
31. Rai L.C., Gaur J.P., Kumar H.D. Phycology and heavy-metal pollution // *Biol. Rev.* — 1981. — Vol. 56, N 2. — P. 99—151.
32. Saadoun I., Schrader K.K., Blevins W.T. Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by *Anabaena sp.* // *Water Research*. — 2001. — Vol. 35, N 5. — P. 1209—1218.
33. Shukla M.K., Tripathi R.D., Sharma N. et al. Responses of cyanobacterium *Anabaena doliolum* during nickel stress // *J. Environ. Biol.* — 2009. — Vol. 30, N 5. — P. 871—876.
34. Siegelman H.W., Kycia J.H. Algal biliproteins // *Handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods* / Ed. by Hellebust J.A., Craigie J.S. — Cambridge: Cambridge University Press, 1978. — P. 72—78.
35. Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins // *Toxic cyanobacteria in water — a guide to their public health consequences, monitoring and management*. — London: E. & F.N. Spon, 1999. — P. 41—111.
36. Smith V.H. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton // *Can. J. Fish. and Aquat. Sci.* — 1986. — Vol. 43. — P. 148—153.
37. Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // *Bacteriol. Rev.* — 1971. — Vol. 35. — P. 171—205.
38. Stauber J.L., Florence T.M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae // *Marine Biology*. — 1987. — Vol. 94. — P. 511—519.
39. Stolte W., Balode M., Carlsson P. et al. Stimulation of nitrogen-fixing cyanobacteria in a Baltic Sea plankton community by land-derived organic matter or iron addition. // *Mar. Ecol., Prog. Ser.* — 2006. — Vol. 327. — P. 71—82.

40. *Standard Test Method for Odor in Water D1292-86* (1999). ASTM International. — 1999. — 7 p.
41. *Tellez M.R., Schrader K.K., Kobaisy M. Volatile Components of the Cyanobacterium *Oscillatoria perornata* (Skuja) // J. Agric. Food Chem. — 2001. — Vol. 49. — P. 5989—5992.*

Научно-исследовательский центр
экологической безопасности РАН,
Санкт-Петербург

Поступила 03.06.10