

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет**

На правах рукописи

Спиркина Наталья Евгеньевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ
Monoraphidium arcuatum КАК НОВОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА ДЛЯ
ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ**

03.02.10 – гидробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Ипатова В.И.

Москва-2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	
1.1. Метод биотестирования в оценке качества водной среды.....	9
1.2. Микроводоросли как объекты научных исследований.....	14
1.2.1. Микроводоросли в системе биотестирования.....	16
1.3. Развитие микроводорослей в культуре.....	20
1.4. Влияние тяжелых металлов на растительные организмы.....	25
1.4.1. Хром: свойства, формы, нахождение в природе и биологические эффекты.....	29
1.4.2. Серебро: свойства, формы, нахождение в природе и биологические эффекты.....	39
1.5. Адаптация микроводорослей к тяжелым металлам.....	47
ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования.....	52
ГЛАВА 3. Особенности развития культуры <i>Monoraphidium arcuatum</i> в норме	
3.1. Получение альгологически чистой культуры <i>Monoraphidium arcuatum</i> ...	63
3.2. Развитие культуры <i>Monoraphidium arcuatum</i> в стандартных условиях...	65
3.3. Развитие культуры <i>Monoraphidium arcuatum</i> в емкостях разного типа...	68
3.4. Влияние степени синхронизации на развитие культуры <i>Monoraphidium</i> <i>arcuatum</i>	75
3.5. Морфологическая характеристика и размерная гетерогенность клеток в культуре <i>Monoraphidium arcuatum</i>	76
3.6. Структура популяции <i>Monoraphidium arcuatum</i>	81
3.7. Изменение качества культуральной среды по мере развития <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i>	84
3.8. Развитие <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i> в смешанной культуре.....	88
ГЛАВА 4. Развитие культуры <i>Monoraphidium arcuatum</i> при воздействии бихромата калия	

4.1. Токсичность бихромата калия для культуры <i>Monoraphidium arcuatum</i> ...	93
4.2. Влияние типа емкости на токсический эффект бихромата калия.....	98
4.3. Влияние степени синхронизации на чувствительность <i>Monoraphidium arcuatum</i> к бихромату калия.....	101
4.4. Структура популяции <i>Monoraphidium arcuatum</i> при воздействии бихромата калия.....	103
4.5. Развитие <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i> в смешанной культуре при воздействии бихромата калия.....	105
ГЛАВА 5. Развитие культур <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i> при воздействии коллоидного серебра	
5.1. Токсичность коллоидного серебра для культур <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i>	109
5.2. Влияние типа емкости на токсический эффект коллоидного серебра...	112
5.3. Изменение токсичности культуральной среды в процессе развития <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i> в присутствии коллоидного серебра.....	115
5.3.1. Изменение токсичности культуральной среды <i>Monoraphidium arcuatum</i> в присутствии коллоидного серебра.....	115
5.3.2. Изменение токсичности культуральной среды <i>Scenedesmus quadricauda</i> в присутствии коллоидного серебра.....	119
5.4. Структура популяций <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i> при воздействии коллоидного серебра.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	127
ВЫВОДЫ.....	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	148
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	171
БЛАГОДАРНОСТИ.....	172

ВВЕДЕНИЕ

Промышленный прогресс и быстрое развитие технологий ухудшают качество окружающей среды и приводят к увеличению разнообразия загрязняющих веществ, большинство из которых в конечном итоге попадает в водоемы. Это приводит к ухудшению свойств воды как ресурса для хозяйственной деятельности человека и как среды обитания водных организмов.

Негативные последствия загрязнения водной среды возникают в результате воздействия различных веществ на биоту, в том числе на фотосинтезирующие организмы, являющиеся основными продуцентами органического вещества в водоемах и участвующие в процессах их самоочищения. Нарушение их жизнедеятельности может изменить функционирование всей экосистемы. Поэтому для мониторинга состояния окружающей среды в условиях антропогенного воздействия актуальна разработка новых и совершенствование уже существующих методов биоиндикации и биотестирования именно с использованием растительных организмов.

Качество воды в открытых водоемах определяется по органолептическим, гидрохимическим и биологическим показателям. Разнообразные физико-химические методы позволяют с высокой степенью точности оценивать качественный и количественный гидрохимический состав воды. Но с помощью этих методов невозможно охарактеризовать реальные последствия загрязнения для гидробионтов. Кроме того, химические соединения, попадая в водную среду, трансформируются под влиянием различных абиотических факторов, в основном физических (осаждение, адсорбция, улетучивание) и химических (диссоциация, гидролиз, комплексообразование, окислительно-восстановительные реакции). Большое значение в трансформации веществ имеет биологический фактор, связанный с жизнедеятельностью гидробионтов, поэтому не всегда можно предугадать, в какой форме вещество воздействует на живые организмы (Филенко, 1988).

Для наиболее адекватной оценки токсичности водной среды для гидробионтов применяют метод биотестирования, позволяющий определить с помощью тест-объектов опасность исследуемого фактора для жизнедеятельности биосистем (Патин, 1991, 2001). Правильный выбор организмов для целей биотестирования является одной из важнейших прикладных задач водной токсикологии. Биологический объект, выбираемый в качестве тест-организма, должен удовлетворять ряду критериев, в том числе должен быть доступным, экономичным и простым для выполнения процедур биотестирования (Филенко, 2007б; Крайнюкова, 2009). Основным требованием к тест-организму являются его чувствительность и представительность.

Незаменимыми тест-объектами в любой системе биотестирования являются микроводоросли, которые обладают коротким жизненным циклом и поэтому позволяют за небольшой срок проследить воздействие токсических веществ в ряду поколений и оценить отдаленные последствия интоксикации. Преимуществом микроводорослей при решении проблем контроля качества водной среды является также возможность изучения действия токсикантов как на клеточном, так и на популяционном уровне (Методики биологических исследований..., 1971; Boyle, 1984; Trainor, 1984; Брагинский и др., 1987; Дмитриева и др., 2002; Schafer et al., 1994).

Несмотря на то, что методики определения токсичности для микроводорослей стандартизированы, существуют большие межвидовые различия в чувствительности по отношению к одному и тому же веществу (Lewis, 1995; Bengtson Nash et al., 2005). Поэтому для наиболее точного определения опасности загрязнения окружающей среды необходимо проводить оценку токсичности с использованием большого набора тест-организмов. В связи с потребностью в выборе новых тест-объектов в настоящей работе была исследована зеленая микроводоросль *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind., которая является типичным представителем и важным звеном в пищевых цепях пресных водоемов Европы, Азии и Южной

Амери́ки и родственна большинству используемых в биотестировании видов хлорококковых водорослей. В литературе отсутствует информация об особенностях развития микроводоросли *M. arcuatum* в длительных экспериментах и о применении ее как тест-объекта для оценки качества природной, сточной воды и грунта.

В связи с вышесказанным, **целью** настоящей работы являлось исследование особенностей развития культуры зеленой хлорококковой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* при длительном культивировании в норме и при интоксикации.

В задачи работы входило:

1. Выделить хлорококковую микроводоросль *M. arcuatum* из пробы фитопланктона и ввести ее в альгологически чистую культуру;
2. Охарактеризовать особенности развития и морфологии клеток культуры *M. arcuatum* в стандартных условиях и при изменении некоторых условий культивирования;
3. Определить чувствительность культуры *M. arcuatum* к тяжелым металлам на примере бихромата калия и коллоидного серебра;
4. Провести сравнительное исследование развития лабораторных популяций *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в норме и при действии токсикантов;
5. Исследовать рост *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в смешанной культуре в норме и при воздействии бихромата калия;
6. На основе полученных данных оценить возможность использования культуры *M. arcuatum* как перспективного тест-объекта для контроля качества водной среды.

Научная новизна работы. Впервые детально исследованы при длительном культивировании особенности развития и структуры популяции альгологически чистой культуры хлорококковой микроводоросли *M. arcuatum*, выделенной из фитопланктона р. Москвы. Установлена зависимость роста *M. arcuatum* от типа емкости для культивирования. Получены новые данные о влиянии фармацевтического препарата

коллоидного наносеребра на культуры микроводорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda*. Обнаружена высокая чувствительность *M. arcuatum* к токсическому воздействию стандартного токсиканта бихромата калия и коллоидного серебра, что позволяет рекомендовать культуру как новый тест-объект для биотестирования качества водной среды.

Теоретическая и практическая значимость работы. Альгологически чистая культура хлорококковой микроводоросли *M. arcuatum* может служить объектом для фундаментальных научных исследований, в частности при изучении процессов направленного биосинтеза в области биотехнологии.

Полученные новые данные о токсичности фармацевтического препарата коллоидного серебра для микроводорослей имеют теоретическое значение в понимании закономерностей влияния серебра на живые организмы. Кроме того, эти данные могут быть использованы в практических целях при установлении допустимого уровня загрязнения воды серебром.

Показана возможность использования культуры *M. arcuatum* как чувствительного тест-объекта для оценки качества водной среды, в том числе в полевых условиях.

Культура *M. arcuatum* используется при проведении практических занятий по водной токсикологии для бакалавров, магистров и стажеров на кафедре гидробиологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Альгологически чистая культура хлорококковой микроводоросли *M. arcuatum* передана на депонирование в коллекцию одноклеточных водорослей IPPAS Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН под номером М-2017.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были доложены на XVIII, XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ-2011» (Москва, 2011), «ЛОМОНОСОВ-2012» (Москва, 2012) и «ЛОМОНОСОВ-2013» (Москва,

2013); на II Международной конференции «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем» (Санкт-Петербург, 2011); на IV и V Всероссийских конференциях по водной экотоксикологии, посвященных памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» (Борок, 2011 и 2014); на Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Киев, 2012); на интернет-конференции I Сабининские чтения (Москва, 2012); на Международной научной конференции «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее», посвященной 80-летию со дня рождения профессора М.В. Гусева (Москва, 2014).

Некоторые результаты диссертационной работы получены при выполнении НИР по гранту РФФИ № 12-02-31782.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (152 источника, из них 94 на английском языке) и Приложений. Работа изложена на 172 страницах (включая Приложение), содержит 32 рисунка и 8 таблиц.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендуемых ВАК.

Личный вклад автора. Представленная работа является обобщением экспериментальных данных, полученных лично автором. Автор принимала непосредственное участие на всех этапах работы: поиске и анализе литературы, планировании и проведении экспериментов, в систематизации, обработке, анализе и интерпретации полученных результатов, в подготовке публикаций.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Метод биотестирования в оценке качества водной среды

Проблема загрязнения окружающей среды и его оценка актуальны и в наши дни. Выделяют несколько видов загрязнений: химические, эвтрофирующие, бактериальные, тепловые, радиационные, шумовые, электромагнитные (Филенко, 1988; Гапочка, 2013).

Проблемой токсичности водной среды занимается водная токсикология, главными задачами которой являются обеспечение объективного контроля изменения состояния водоемов, исследование закономерностей воздействия химических факторов на водные организмы и оценка их потенциальной биологической опасности (Филенко, 1988; Крайнюкова, 2009).

Одним из важнейших методов водной токсикологии, позволяющим обеспечить решение этих задач, является биотестирование, которое с помощью специально подготовленных организмов (тест-объектов) решает широкий спектр природоохранных задач (Филенко, 1988). Чаще всего это оценка сточных и технологических вод с выявлением наиболее опасных компонентов, тестирование химических препаратов разного назначения, оценка состава донного грунта, контроль качества воды рыбохозяйственных водоемов. Биотестирование, в отличие от других, даже самых тонких аналитических методов, позволяет определить, насколько опасен исследуемый фактор для жизнедеятельности биосистем (Патин, 1991, 2001).

Правильный выбор организмов и функций для целей биотестирования является одной из важнейших прикладных задач водной токсикологии. Биологический объект, выбираемый в качестве тест-организма, служит своего рода датчиком токсичности водной среды и должен удовлетворять ряду критериев, в том числе должен быть доступным, экономичным и простым для выполнения процедур биотестирования. Основным требованием к тест-организму являются его чувствительность к действию токсических

веществ и представительность для своего трофического уровня (Филенко, 2007б; Крайнюкова, 2009).

Представительный организм по своим физиологическим и биологическим свойствам должен быть близок к наиболее распространенной в водоеме группе организмов, имеющей существенное значение для функционирования экосистемы. Основатель водной токсикологии в России Н.С. Строганов считал целью оценки токсичности водной среды определение биологического благополучия полезных для человека видов в водоеме, таких как промысловые организмы (Строганов, 1971).

Для получения адекватной оценки качества воды в мировой практике биотестирования применяют организмы, представляющие разные трофические уровни. К традиционным тест-объектам, для каждого из которых разработана система исследуемых показателей, относятся бактерии, микроводоросли, высшие растения, простейшие (инфузории), ветвистоусые рачки, моллюски, рыбы. При разработке нормативов качества воды в водоемах рыбохозяйственного значения в обязательном порядке рекомендуют проводить испытания хотя бы на одном представителе от каждой экологической группы (Методические указания..., 1998; Методические указания..., 2011; РД 118-02-90). Наиболее ответственной является токсикологическая оценка сточных вод на сбросе в водный объект (Строганов, 1971).

В токсикологических исследованиях водные организмы-продуценты представлены планктонными одноклеточными водорослями из разных отделов (*Scenedesmus quardicauda*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*), водорослями-макрофитами (*Ahnfeltia tobuchiensis*, *Chondrus pinnulatus*) и высшими (сосудистыми) водными растениями (*Elodea canadensis*, *Lemna minor*, *Zostera marina*). Водные растения, обладающие большой фитомассой, помимо общих для всех продуцентов свойств, служат укрытием и местом размножения для многих организмов. Следующее звено - это простейшие, в основном инфузории

(*Paramecium caudatum*, *Stylonichia mytilus*, *Euplotes harpac*, *Urostula marina*, *Keronopsis multistilata*), которые являются кормовой базой для зоопланктона и молоди рыб, участвуют в процессах самоочищения. В качестве типичных представителей зоопланктона применяют ракообразных, чаще всего ветвистоусых рачков *Daphnia magna*, *D. longispina*, *D. carinata*, *Ceriodaphnia affinis*, *Moina macroscopa*. В морских токсикологических исследованиях объектом служат наиболее чувствительные стадии развития жаберного рачка *Artemia salina*. Удобным объектом, позволяющим за короткое время наблюдать отдаленный эффект интоксикации (3 поколения за 14 суток), является *Brachionus plicatilis plicatilis* - представитель коловраток, которые составляют существенную часть планктона морских вод. Коловратки питаются бактериями, устраняя бактериальные загрязнения, и сами служат кормом для многих морских организмов. При оценке токсического действия на бентосные организмы наиболее часто используют пресноводного брюхоногого моллюска *Limnea stagnalis* или морского моллюска *Littorina* sp., а также ракообразных (бокоплавы), морских ежей и двустворчатых моллюсков, например, мидий, опыты с которыми длятся несколько часов и применимы в условиях экспедиции. Наиболее высокоорганизованные организмы – рыбы (данио рерио *Brachydanio rerio*, гуппи *Poecilia reticulata*, треска, сельдь и многие другие) - позволяет оценивать влияние веществ на различные системы органов и процессы жизнедеятельности, о чем судят по клиническим и биохимическим показателям крови, а также гистологическим и гистохимическим изменениям в тканях (Методические указания..., 2011).

Пригодность используемых тест-объектов для токсикологических исследований периодически проверяют в краткосрочных опытах по их чувствительности к эталонному токсиканту (токсикант сравнения, референтный стандарт, стандартный токсикант), в качестве которого служит вещество с известными токсическими свойствами. В европейских странах используют фенол и его производные, например, 3,5-дихлорфенол (OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006), в Канаде референсом обычно

служат ионы Zn^{2+} ($ZnSO_4$), Cu^{2+} ($CuCl_2$ или $CuSO_4$) и $NaCl$ (Blaise, Vasseur, 2005). В России в качестве эталонного вещества наиболее распространен **бихромат калия** (Методические указания..., 2011; ГОСТ Р 54496-2011; РД 118-02-90).

Показателем токсичности действия вещества служит целый спектр биологических критериев, начиная от гибели организма и заканчивая тонкими молекулярными перестройками его ферментативных систем (Патин, 2001). Самыми существенными показателями биологического благополучия любого организма являются его выживаемость, плодовитость и качество потомства, определяющие его сохранность как вида (Строганов, 1971). В конечном итоге, результат биотестирования должен давать ответ на вопрос, какую концентрацию токсиканта нельзя превышать, чтобы сохранить необходимые для функционирования водоема биологические процессы. Различают пороговые, сублетальные и летальные (остротоксичные) концентрации токсикантов (Патин, 2001). Пороговые концентрации токсиканта не приводят к гибели, но достоверно нарушают какие-либо из исследуемых функций организма. В экспериментальных исследованиях определяют диапазон действующих концентраций токсиканта от минимально действующей до минимально летальной. Острую токсичность определяют в краткосрочных экспериментах длительностью от нескольких минут до 4 суток, однако по этим данным невозможно предсказать, что будет происходить с организмом в дальнейшем, особенно при действии малых концентраций токсиканта (Дмитриева и др., 1992; Бойчук, 2007). Прогнозировать состояние биологических процессов в водоемах и распознать скрытое токсическое воздействие среды позволяют более долгосрочные эксперименты, которые служат для определения хронической токсичности (Строганов, 1971).

Продолжается поиск новых методов биотестирования, более оперативных и чувствительных, чем уже используемые. Например, в последние годы стали применять новый класс аналитических систем –

биологические сенсоры, чувствительным элементом которых являются бактериальные клетки, способные к биолюминесценции (Зарубина и др., 2012; Bulich et al., 1990; Menz et al., 2013). Метод удобен в качестве скринингового теста для выявления как острого, так и хронического загрязнения, при этом получаемые результаты хорошо коррелируют с результатами традиционных методов.

Оптимизация методов биотестирования ведется также в направлении усовершенствования измерительных приборов, позволяющих получать ответ более эффективно и быстро как в лабораторных условиях, так и в полевых. К таким приборам относятся, например, хорошо зарекомендовавшие себя флуориметры, действие которых основано на принципе импульсноамплитудной модуляции (далее - РАМ). В начале столетия немецкой фирмой Walz был внедрен и разработан портативный прибор ToxY-РАМ, предназначенный для определения в воде фитотоксикантов при помощи микроводорослей (Bengtson Nash et al., 2005). Высокая чувствительность датчиков таких приборов позволяет улавливать малейшие изменения квантового выхода фотосинтеза даже при очень низких концентрациях токсикантов.

При исследовании качества водной среды с конца 80х годов прошлого века применяется метод проточной цитометрии (Yentsch, Pomponi, 1986), с помощью которого измеряют общее количество клеток и индивидуальные размеры каждой клетки, флюоресценцию хлорофилла (Franqueira et al., 2000), а также жизнеспособность и ферментативную активность, например, эстеразную (Franklin et al., 2001). В настоящее время проточная цитометрия довольно широко используется в токсикологических процедурах и служит хорошей альтернативой традиционным методам анализа водорослей из лабораторных культур и природных источников (Franqueira et al., 2000; Yu et al., 2007; Croxton et al., 2015). С распространением в токсикологии методов проточной цитометрии стало возможным уменьшить начальную плотность

клеток, чтобы результат исследования был максимально приближен к прогнозируемому в природных условиях (Franklin et al., 2002).

В качестве альтернативы к более ранним, стандартным методам биотестирования в колбах, еще в 1986 году были разработаны миниатюризированные тесты с микроводорослями. Согласно этой методике, определение токсичности образцов проводится в пластиковых микропланшетах на 24-96 ячеек с рабочим объемом 0.2-2 мл, где каждая ячейка представляет собой отдельный биореактор с контролируемыми параметрами роста (Blaise, Vasseur, 2005; Geis et al., 2000). В микропланшетах проводят эксперименты длительностью от 1 часа до 30 суток по определению токсичности жидкостей и растворимых веществ, результаты которых сопоставимы с соответствующими результатами в колбах. Данный метод является значительным шагом на пути к автоматизации, упрощению и ускорению процедуры биотестирования. Маленький объем опытных образцов экономит место в инкубаторе, сокращает время и стоимость процедуры, позволяет увеличить количество повторностей и получить более точный результат. Одноразовые посуда и наконечники позволяют избежать контаминаций, связанных с моющими средствами и старением посуды, благодаря автоматизированным многоканальным дозаторам сокращается время постановки эксперимента. В результате описанных преимуществ метода повышается точность исследований и возрастает общая продуктивность лаборатории.

1.2. Микроводоросли как объекты научных исследований

Микроводоросли давно служат объектами исследования при изучении и моделировании разнообразных процессов, для решения прикладных и фундаментальных задач. Понятие «микроводоросли» включает в себя как одноклеточные формы, так и многоклеточные (например, синезеленые нитчатые, или цианобактерии - *Oscillatoria*, *Anabaena*). Изучение одноклеточных водорослей более предпочтительно, поскольку они сочетают

в себе свойства отдельных клеток, но реагируют на внешнюю среду как самостоятельный организм (Лозина-Лозинский, 1966). Микроводоросли служат удобным модельным объектом для изучения механизмов дыхания и фотосинтеза, подбора условий для максимальной продуктивности в работе фотосинтетического аппарата, что также играет важную роль в разработке эффективных систем по получению биотоплива (Work et al., 2012).

Исследования проводят на альгологически чистых культурах, применение которых, впервые опробованное известным голландским бактериологом Бейеринком (Артари, 1903), а в настоящее время практикуется повсеместно в лабораториях всего мира.

Высокое содержание большого количества различных веществ (аминокислот, макро- и микроэлементов, пигментов, масел и др.) в клетках микроводорослей делает их ценным ресурсом для решения целого ряда медико-биологических, фармацевтических и химических производств. Роль микроводорослей в биотехнологии связана в первую очередь с разработкой процессов направленного биосинтеза, с помощью которых возможно регулирование образования микроводорослями тех или иных веществ (Макарова и др., 2009).

Клетки микроводорослей богаты маслами, что делает их перспективным сырьем для получения биотоплива. Более того, биотопливо, получаемое из водорослей, отличается высокой степенью биodeградации, нетоксично и не содержит серы (Макарова и др., 2009). В настоящее время ведется большое количество генно-инженерных исследований по изучению возможностей модификации генома микроводорослей с целью эффективного получения биотоплива (Radakovits et al., 2010).

Широкое применение микроводорослей в сфере охраны окружающей среды обусловлено возможностью проследить воздействие неблагоприятного фактора на популяцию в целом на протяжении многих поколений и выявить отдаленные последствия (Boyle, 1984; Trainor, 1984; Брагинский и др., 1987; Дмитриева и др., 2002). Исследования чувствительности микроводорослей к

различным воздействиям требуют поиска видов-индикаторов загрязнения и видов, способных к быстрому поглощению, инаktivации и утилизации загрязняющих веществ в водоемах (биоремедиации). Водоросли, обладающие высокой чувствительностью даже к низким концентрациям тяжелых металлов, как, например, *Chlamydomonas renhardtii*, хорошо подходят на роль биосенсора при загрязнении воды, однако слишком чувствительны для целей биоремедиации (Rodríguez et al., 2007).

Колоссальная способность многих микроводорослей сорбировать металлы дает огромный потенциал для их использования при восстановлении сточных вод, особенно в условиях радиационного загрязнения (Queiroz et al., 2012). Сорбция включает в себя связывание металлов на поверхности клетки или же внутри нее с помощью внутриклеточных лигандов. На сорбцию оказывает влияние концентрация металла в растворе, pH, температура раствора и присутствие в нем ионов, а также стадия метаболизма, в которой находится организм. Различные предварительные воздействия могут усиливать сорбционную способность водорослей, в связи с этим большой научный интерес связан с разработкой моделей сорбции. Также с водорослями проводят генетические манипуляции для увеличения количества поверхностных групп связывания и повышения экспрессии металлсвязывающих белков (Mehta, Gaur, 2005).

1.2.1. Микроводоросли в системе биотестирования

Определение качества воды с помощью микроводорослей в обязательном порядке входит в процедуру биотестирования во всех странах мира (ГОСТ Р 54496-2011; ISO-28692; U.S. Environmental Protection Agency, 1996). Микроводоросли также являются неотъемлемым звеном при разработке нормативов ПДК (Методические указания..., 1998; Методические указания..., 2011).

Культуры микроводорослей применяют и для диагностики состояния почв, где с их помощью проводят определение степени плодородия

(обеспеченность почвы питательными веществами и микроэлементами) либо токсичность почвы, если имеет место какое-либо загрязнение. Состояние почвы оценивают по реакции водорослей, непосредственно в ней обитающих, на добавление различных удобрений (Tchan, 1959), или же с помощью тест-культур водорослей (Cullimore, 1966). Обладая сходной с высшими растениями физиологией, водоросли проявляют сходные с ними реакции на изменение условий среды, что особенно ценно для объективной оценки почвы как хозяйственного ресурса.

В последнее время, в связи со значительным увеличением электромагнитного фона Земли, микроводоросли все чаще выступают тест-объектами при исследовании влияния электромагнитного излучения на гидробионтов и качество среды их обитания (Гапочка, 2013).

Восприимчивость организма к различным воздействиям изменяется в процессе его онтогенеза и зависит от стадии развития и физиологического состояния (Строганов, 1971). Есть данные, что в экспоненциальной фазе роста культура водорослей обладает повышенной чувствительностью, тогда как в период стационарной фазы устойчивость культуры значительно повышается (Ждан-Пушкина, Хасанова, 1991). Помимо процессов внутренней регуляции, развитие культуры микроводорослей обусловлено воздействием внешних факторов. Водоросли быстро реагируют на изменение условий выращивания, поэтому для проведения испытаний требуется строгий контроль параметров культивирования. Например, повышение температуры до 25°C усиливает токсическое действие веществ, а при понижении температуры до 12-15°C, наоборот, оно проявляется слабее и с задержкой во времени (Филенко, 1988).

Большое значение для результата токсикологического эксперимента имеет исходная плотность клеток. Высокая плотность при продолжительном испытании может повлиять на химические процессы, свойства, токсичность и биодоступность тестируемых веществ, что происходит из-за изменения pH культуральной среды вследствие выработки водорослями большого

количества углекислого газа (Nyholm, Källqvist, 1989). Часто этот показатель завышен по сравнению с численностью клеток водорослей в природных местообитаниях, что обусловлено невозможностью измерить результат эксперимента при более низких плотностях. В экспериментах с *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) и с тропической пресноводной водорослью *Chlorella* sp. токсичность меди снижалась с увеличением исходной плотности клеток. Концентрация меди, которая была необходима для 50%-го ингибирования численности клеток за 72 часа, увеличивалась с 6.6 до 17 мг/л для *S. capricornutum* и с 4.6 до 16 мг/л для *Chlorella* sp. по мере того, как исходную плотность клеток увеличивали с 10^2 до 10^5 кл/мл. Результаты измерения концентрации меди внутри клеток и в культуральной среде подтвердили, что при высокой исходной численности клеток на каждую клетку приходилось меньше меди, в результате чего с ростом культуры токсичность меди понижалась. Снижение токсичности меди было связано, в первую очередь, с уменьшением концентрации меди в среде, тогда как изменение свойств среды из-за связывания с экссудатами водорослей и изменение pH играло второстепенную роль. Эти данные дают основание предполагать, что стандартные статические лабораторные токсикологические испытания, в которые берут 10^4 - 10^5 кл/мл, могут серьезно недооценивать токсичность металла в природных водах (Franklin et al., 2002).

Также есть данные исследования влияния начальной плотности популяции зеленой микроводоросли *S. quadricauda* на токсичность бихромата калия и антибиотика стрептомицина. Исходная плотность 100-400 тыс. кл/мл не оказывала влияния на токсичность бихромата калия, которая, однако, существенно снижалась, когда исходная плотность превышала 500 тыс кл/мл. Таким же образом изменялась токсичность стрептомицина в концентрации 1 мг/л при соответствующих изменениях исходной плотности. Авторы отмечают исходную плотность величиной 10^2 - 10^4 кл/мл как оптимальную для проведения токсикологических испытаний, тогда как при плотности, превышающей 10^5 кл/мл, результаты могут искажаться.

Постановка эксперимента с исходной плотностью водорослей, типичной для природных вод (ниже 10^4 кл/мл), затрудняет прямой подсчет клеток (Ипатова и др., 2011).

Для решения проблем контроля качества водной среды используют различные микроводоросли, среди которых встречаются представители цианобактерий (*Anabaena flos-aquae* и *Synechococcus leopoliensis*), и диатомовых водорослей (*Navicula pelliculosa*) (OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006). Чаще всего наиболее востребованными оказываются представители зеленых хлорококковых водорослей, в основном относящихся к семейству Scenedesmaceae (*Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus* (= *Desmodesmus*) *subspicatus*) и Selenastraceae (*Selenastrum capricornutum*, *Pseudokirchneriella subcapitata*) (Hsieh et al., 2006; ISO-8692, 1989; OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006). В России в качестве тест-объекта при проведении стандартной процедуры биотестирования рекомендован вид *Scenedesmus quadricauda* (Жмур, Орлова, 2007; ГОСТ Р 54496-2011), тогда как в странах Европы и в США чаще используют водоросль *P. subcapitata* (OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006), в Канаде - *S. capricornutum* (Blaise, Vasseur, 2005).

Модельная культура *S. capricornutum* (штамм NIVA-CHL 1), выделенная в 1959 году из реки Нителва (Норвегия), быстро стала популярной в качестве тест-объекта для оценки фитотоксичности в странах Европы и Северной Америки, где в это время активно разрабатывались методики биотестирования. Впоследствии неоднократно изменялась таксономическая принадлежность водорослей культуры «*Selenastrum capricornutum*»: сначала их стали относить к представителям *Raphidocelis subcapitata*, а позже - к *Pseudokirchneriella subcapitata* (Nygaard et al., 1986). По данным 2011 года (Krienitz et al., 2011), на основании проведенного молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности малой субъединицы рибосомальной РНК, таксономическое положение повсеместно используемого в биотестировании штамма «*Selenastrum*

capricornutum» было определено как *R. subcapitata* (род *Raphidocelis*). В настоящее время в методических руководствах с использованием первоначального штамма можно встретить как обозначение «*Pseudokirchneriella subcapitata*», которое более распространено в Европе, так и «*Selenastrum capricornutum*», более привычное для стран Северной Америки (Blaise, Vasseur, 2005).

1.3. Развитие микроводорослей в культуре

Чтобы выделить культуру водоросли из естественного местообитания, необходимо сначала в лаборатории получить накопительную культуру. Для этого собранный материал (вода, зеленый налет, слизь и др.) переносят в сосуды с питательной средой и адаптируют к лабораторным условиям. Поскольку исходное сообщество состоит из разных по экологическим и биологическим характеристикам видам, создают максимально благоприятные для развития желаемого организма условия (освещенность, температура, степень аэрации и др.), что позволяет ему развиваться более интенсивно по сравнению с остальными организмами, для которых эти условия не являются оптимальными (Сиренко и др., 1975).

Выращивание водорослей в лабораторных емкостях происходит в стационарном, или накопительном режиме. Этот способ выращивания называют также периодическим культивированием. За время роста культуры в нее не поступают питательные вещества и не удаляются продукты обмена, и только в некоторых случаях может иметь место дополнительный газообмен. В таких условиях для развития культуры микроводорослей, как и любой культуры микроорганизмов, характерна фазность. Переход культуры от одной фазы к другой регулируется определенными клеточными экзометаболитами, расходом питательного ресурса среды и накоплением в ней продуктов обмена. В процессе развития культуры клетки водорослей выделяют различные по химическому составу метаболиты,

которые выполняют важную регуляторную функцию, формируют из отдельных клеток согласованно функционирующую популяцию.

При посеве водорослей в чистую среду рост численности клеток может отсутствовать некоторое время, в течение которого происходит синтез и накопление метаболитов. Этот период, называемый лаг-фазой, служит для перестройки обменных процессов в новых условиях культивирования и для подготовки к активному размножению (Ждан-Пушкина, Хасанова, 1991). Следующая фаза роста – логарифмическая или экспоненциальная, переход к которой связан с окончанием адаптации клеток и характеризуется наиболее высокой скоростью роста, не лимитированной питательным ресурсом среды. По мере истощения среды и накопления метаболитов повышается гетерогенность популяции, процессы размножения в культуре замедляются, рост численности происходит некоторое время с постоянной скоростью, линейно, после чего культура переходит к стационарной фазе роста. Для этой фазы характерно отсутствие прироста численности клеток, дальнейшее замедление размножения и увеличение гибели клеток. В стационарной фазе также много покоящихся клеток – живых, но потерявших способность к размножению. К факторам, определяющим переход культуры к стационарной фазе роста, относится также плотность клеток, которая достигает определенного предела. Переход к завершающему этапу развития культуры – фазе отмирания - происходит тогда, когда процесс гибели клеток начинает преобладать над размножением.

Рядом авторов отмечается влияние геометрии фотобиореактора и толщины слоя культуральной среды на интенсивность роста численности микроводорослей. Так, интенсивность развития культуры *Dunaliella viridis* в вертикальном культиваторе была очень низкой и практически не зависела от толщины слоя культуральной среды, тогда как в горизонтальном культиваторе водоросли развивались интенсивнее и прослеживалась прямая зависимость от толщины слоя. Кроме того, выращенные в разных емкостях культуры характеризовались разным химическим составом клеток (Божков,

Мензянова, 1997). Другие авторы более интенсивное развитие *D. viridis* также связывают с толщиной слоя питательной среды и типом культиватора (Ладыгина, 2005). Так, при одинаковых внешних условиях максимальная биомасса и численность клеток была вдвое выше в колбах объемом 1 л, чем в полиэтиленовых мешках (объем 18 л).

Исследования с микроводорослями можно проводить в пластиковых микропланшетах на 96 лунок, каждая из которых является автономным биореактором. При развитии водорослей в микропланшетах проявляется так называемый «краевой эффект», когда скорость роста в лунках, расположенных по краю планшета, где происходит более интенсивное испарение, значительно превышает скорость роста в центральных лунках (Blaise, Vasseur, 2005; Pacheco et al., 2013).

В условиях лабораторного культивирования часто отмечают неравномерное развитие водорослей в течение года. Такие флуктуации могут быть связаны как с природными циклами развития микроводорослей, так и с неконтролируемыми параметрами, такими, например, как магнитная обстановка Земли, солнечная активность и некоторые другие. Известно, что в естественных местообитаниях для каждой группы водорослей характерен определенный период, когда условия для развития данной группы наиболее благоприятны. Так, диатомовые водоросли особенно многочисленны весной и осенью, а зеленые водоросли способны развиваться круглый год. В связи с этим, виды диатомовых, которые применяются в основном для оценки качества морской среды, сложнее культивировать и поддерживать в состоянии готовности к экспериментам (Брагинский и др., 1987).

Известно, что природные популяции водорослей более гетерогенны, чем лабораторные, т.е. особи в них различаются по возрасту, размерам, физиологической активности и, как следствие, по реакции на изменение внешних условий. Неоднородный качественный состав популяции является биологическим механизмом ее устойчивости и адаптации (Гапочка, 1981). Лабораторные культуры синхронизируют, чтобы сделать их более

гомогенными. В такой культуре клетки находятся примерно на одной фазе жизненного цикла и в одном физиологическом состоянии, ее можно рассматривать как единый организм (Успенская, 1966; Tamiya, 1966).

В зависимости от целей исследования, различают физиологическую, морфологическую, размерную гетерогенность и некоторые другие. Размерная гетерогенность формируется за счет изменения в процессе жизненного цикла водоросли индивидуальных размеров клеток. Например, клетки *Selenastrum capricornutum* в экспоненциальную фазу роста мельче своих средних размеров, а при наступлении стационарной фазы становятся крупнее (Blaise, Vasseur, 2005). На примере *Scenedesmus armatus* (Chod.) Chod. для видов рода *Scenedesmus* был описан цикломорфоз, или временное появление различных морфологических типов, последовательно сменяющих друг друга при изменении внешних условий. Эти временные изменения опосредованы температурой и доступностью питательных веществ, при низких температурах скорости деления замедляются, в результате чего клетки увеличиваются в размерах, причем в основном за счет ширины, длина мало изменяется, и на бедных, олиготрофных средах этот эффект усугубляется. При низкой температуре образуется 8-клеточная экоморфа (Trainor, 1992). Так, водоросли рода *Scenedesmus*, которая в природных условиях представлена в основном 4-8-16-клеточными ценобиями, в лаборатории зачастую встречаются в виде отдельных клеток, поскольку на искусственных питательных средах связи между клетками могут ослабевать. Морфология *Scenedesmus* зависит также от плотности клеток в популяции, при низкой плотности формируются одноклеточные формы (Egan, Trainor, 1989).

При работе с культурами водорослей следует учитывать, что морфология и размеры клеток в лабораторных культурах могут отличаться от наблюдаемых в природных условиях (Nakamura, 1963).

В промышленных условиях микроводоросли выращивают в фотобиореакторах открытого и закрытого типа, при закрытом культивировании поступление питательных веществ и газов строго

контролируется (Borowitzka, 1999). Основными физико-химическими факторами, влияющими на рост культуры, являются возможность эффективно использовать энергию света, интенсивность газообмена (удаление кислорода и поступление углекислого газа) и массообмена (обеспечение питательными веществами и удаление экзометаболитов). Уменьшение толщины слоя культуральной жидкости обеспечивает необходимую интенсивность газообмена культуры и улучшает освещенность. Сравнивая культивирование в открытых прудах и трубчатых фотобиореакторах, уделяют особое внимание потенциальному содержанию в среде углекислого газа и кислорода. Этот показатель определяется как отношение объема культуры к площади поверхности культиватора.

Развитие микроводорослей в смешанных культурах

В естественных местообитаниях микроводоросли существуют в составе природных фитосообществ, где они вступают в межвидовые взаимодействия, вырабатывая при этом определенные адаптационные стратегии, изучение которых важно для природоохранных целей. Моделирование природных условий в лаборатории осуществляют путем создания смешанных культур, в которых разные популяции развиваются за счет использования общего ресурса. При конкурентном взаимодействии одни популяции проявляют высокий конкурентный эффект по отношению к партнерам (виолентность), которые, в свою очередь, формируют различные адаптационные механизмы к конкурентному вытеснению (пациентность и эксплерентность) (Ильяш, 1998). Виолентность популяции формируется за счет высокой скорости роста при уменьшении объемов клеток или выделения экзометаболитов, подавляющих рост конкурентных популяций. Адаптационные механизмы устойчивых к конкурентному вытеснению (пациентных) популяций направлены на формирование внутриклеточных запасов (в основном – азота и фосфора) в период обилия ресурса. Такие популяции характеризуются способностью ассимилировать органические

субстраты и в целом большей экономичностью обменных процессов. При низкой конкурентоспособности у эксплерентных популяций основной адаптации в условиях смешанного культивирования становятся механизмы выживания, например, переход в покоящееся состояние после быстрого развития в начальный период.

Способность растительных организмов и микроорганизмов выделять вещества, которые влияют на рост и развитие других организмов (обычно ингибируют), называют аллелопатией. Аллелопатические водоросли используют с целью улучшения экологической обстановки в водоемах для борьбы с цианобактериями, выделяющими опасные токсины (Gross, 2003). У одного из таких видов, *Microcystis aeruginosa*, происходило ингибирование роста и фотосинтеза при совместном культивировании с зеленой водорослью *Scenedesmus obliquus* даже в соотношении 100:1, а также при действии ее фильтратов, что говорит о роли метаболитов в наблюдаемом эффекте (Jia et al., 2008). Однако рост *S. obliquus* ингибировался в присутствии макрофитов (*Chara globularis*, *Elodea canadensis*, *Myriophyllum spicatum*), чего не происходило в их фильтратах. В данном случае конкуренция за пищевой ресурс была более сильным фактором, чем аллелопатические взаимодействия видов (Lürling et al., 2006).

1.4. Влияние тяжелых металлов на растительные организмы

Загрязнение водной среды тяжелыми металлами (далее – ТМ) представляет собой серьезную угрозу, которую относят к самостоятельной экологической проблеме. ТМ являются наиболее опасными загрязняющими веществами: попадая в водоемы, они включаются в различные экологические циклы. Сточные воды, содержащие ТМ, могут значительно сказаться на состоянии природных популяций живых организмов, приводя к изменению их плотности, состава, разнообразия и групповой структуры (Мур, Рамамурти, 1987). Водные растения, в отличие от наземных, более подвержены интоксикации, так как поглощают вещества из окружающей их

среды всей поверхностью, а наземные – только из почвы при помощи корней (Volland et al., 2012). Наибольшая опасность загрязнения водоемов ТМ связана с биологической и физиологической активностью многих из них, а также с тем, что при действии природных факторов металлы практически не разрушаются, в отличие от органических загрязнителей (Филенко, 1988). Источники попадания ТМ в окружающую среду чрезвычайно разнообразны, но основная доля металлов поступает антропогенным путем в результате несоблюдения правил хранения, использования и утилизации химических отходов (Мур, Рамамурти, 1987).

В биологической классификации «тяжелыми металлами» называют металлы с атомной массой более 50 а.е.м., часто имеющим удельную плотность свыше 5 г/см^3 (Алексеев, 2008). Многие ТМ, например, медь, кобальт, цинк, железо, служат микроэлементами и чрезвычайно важны для нормального функционирования живых организмов (Дмитриева и др., 2002; Алексеев, 2008). В основном микроэлементы входят в состав различных биологически активных веществ, витаминов и ферментов и катализируют процессы синтеза органических веществ. Недостаток функциональных соединений может привести к серьезным нарушениям в обмене веществ растений (Алексеев, 2008).

Токсичность ТМ возрастает с увеличением их атомной массы и зависит от степени окисления (Алексеев, 2008). При превышении физиологических концентраций, ТМ являются цитоплазматическими ядами, они оказывают разнообразный по действию и времени проявления токсический эффект и вызывают широкий спектр нарушений. Биологические последствия зависят от природы металла, типа химического соединения и от его концентрации (Филенко, 1988; Дмитриева и др., 2002). Способность металлов к образованию комплексных соединений с органическими веществами способствует их проникновению внутрь клеток (Алексеев, 2008). Не имеющие заряда комплексы жирорастворимы и поэтому могут проходить через клеточную мембрану (Альберт, 1971). Металлы могут менять

проницаемость мембран и даже модифицировать нуклеиновые кислоты, проявляя генотоксичность. Многие металлы (медь, ртуть, свинец, бериллий, кадмий, серебро и др.) способны ингибировать активность ферментов щелочной фосфатазы, каталазы, оксидазы, рибонуклеазы (Дмитриева и др., 2002; Алексеев, 2008). ТМ могут ингибировать процессы деления клеток водорослей на разных этапах клеточного цикла (Прохоцкая, 2000; Machado, Soares, 2014). Некоторые металлы обладают высоким сродством к металлам, играющим ключевую роль в метаболизме клеток. Так, кадмий является химическим аналогом цинка и может включаться вместо него в состав разных ферментов, участвующих в процессе дыхания, белковом и нуклеиновом обмене и др., и нарушать их. В результате возникает острая цинковая недостаточность, которая может привести к гибели растения (Алексеев, 2008). Исследования с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии показали, что клетки *Micrasterias denticulata* способны накапливать значительные количества хрома и железа, причем по мере интоксикации отношение Cr:Fe увеличивалось, что предполагает возможное поглощение хрома вместо железа (Volland et al., 2012).

Водоросли отличаются от высших растений большим биохимическим разнообразием, и, как следствие, большей потребностью в биокатализаторах, роль которых нередко играют ТМ. Действие ТМ на водоросли зависит от многих факторов (концентрация, физико-химические характеристики металла и среды, физиологическое состояние водорослей, видовая чувствительность объекта), большое значение на характер взаимодействия с металлами имеет также изменение условий выращивания и уровень метаболизма организма (Дмитриева и др., 2002; Алексеев, 2008). Токсический эффект проявляется широким спектром различных нарушений, большинство из которых в результате приводят к повреждениям хлоропластов и ультраструктуры мембран (Rodríguez et al., 2007). Взаимодействие тяжелых металлов с клеточной стенкой имеет первостепенное значение в проявлении токсичности (Дмитриева и др., 2002).

Механизм токсичности ТМ в первую очередь связан со способностью их катионов вступать во взаимодействие с клеточной поверхностью, которая имеет отрицательный заряд. В результате этого поверхностный заряд мембран изменяется и нарушается их проницаемость, что приводит к нарушению жизнедеятельности клеток. Попадая в клетку, ионы металлов связываются с эндогенными белковыми молекулами через функциональные группы, чаще всего реагируя с сульфгидрильными, или тиоловыми, группами (SH-), блокируя тем самым работу ферментов и нарушая функцию структурных белков. Такие металлы (ртуть, свинец, мышьяк, кадмий, сурьма и некоторые другие) относятся к группе тиоловых ядов (Филенко, 1988).

Токсический эффект ТМ с переменной валентностью, например, хрома и меди, связывают в основном с образованием активных форм кислорода (АФК), в результате чего нарушается окислительно-восстановительный баланс клетки и наступает окислительный стресс. При токсических концентрациях металла уровень АФК становится настолько высоким, что клетка не может справиться и возникают необратимые повреждения. Тяжелые металлы могут вызывать окислительный стресс, напрямую увеличивая содержание АФК внутри клетки, а также опосредованно, через воздействие на антиоксидантную систему клетки (Pinto et al., 2003; Takami et al., 2012).

В качестве защитного механизма у водорослей, как и у любого другого живого организма, существуют антиоксидантные ферментные системы (каталаза, супероксиддисмутаза и др.), которые нейтрализуют возникающие АФК. При интоксикации ТМ водоросли образуют большое количество антиоксидантов неферментной природы, к которым относятся низкомолекулярные вещества (глутатион, цистеин, аскорбат, каротиноиды, фитохелатины, фенолы, флавоноиды, токоферолы). Низкомолекулярные клеточные антиоксиданты входят в группу тиоловых соединений, или тиолов, и содержат функциональные сульфгидрильные (тиоловые) группы (SH-). Обладая высокой реакционной способностью, тиоловые соединения,

первыми связываются с образовавшимися в клетке АФК, нейтрализуя их. Кроме того, тиолы являются лигандами в процессах комплексообразования с тяжелыми металлами. Уровень тиоловых соединений в клетке или в организме целом является показателем оксидативного стресса (Pinto et al., 2003). В клетках растений, которые находятся в условиях хронического загрязнения металлами, выявляется высокая активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы, высокий уровень глутатиона и снижение уровня перидинина, тогда как содержание бета-каротина практически не изменяется. Однако в случае острой токсичности металлов уровень бета-каротина в клетках увеличивается более чем вдвое, но активность антиоксидантных ферментов при этом возрастает лишь слегка (Okamoto et al., 2001; Takami et al., 2012). Каротиноиды (наиболее распространенные в водной среде - фукоксантин, перидинин, атаксантин и β -каротин), преимущественно находятся в хлоропластах и не только расширяют спектр поглощения света, но и защищают светособирающие пигменты в антенных комплексах от фотохимических повреждений, вызванных АФК, выступая в качестве гасителей (Okamoto et al., 2001).

Тиоловые соединения, которые выделяются в процессе жизнедеятельности фитопланктонных сообществ (в частности глутатион и различные фитохелатины), обнаруживаются в океане, где они также участвуют в процессах детоксикации, снижая окислительный стресс от тяжелых металлов и других загрязняющих веществ. Например, в эстуарных водах залива Галвестон (Техас, США) повсеместным был фитохелатин-2 и преобладала растворенная фракция тиолов, тогда как фаза взвешенных частиц была более разнообразной (Tang et al., 2000).

1.4.1. Хром: свойства, формы, нахождение в природе и биологические эффекты

Поскольку в нашей работе в качестве одного из токсикантов был выбран бихромат калия, мы посчитали необходимым более подробно

остановиться на характеристики хрома, как основного действующего компонента это вещества.

Хром (химическое обозначение «Cr») является твердым металлом голубовато-белого цвета с плотностью 7.2 г/см^3 , температурой плавления 1860°C и температурой кипения 2671°C . Он относится к тяжелым металлам с переменной валентностью и способен образовывать комплексные ионы (Куриленко, 1974). Хром широко распространен в природе, он занимает 21-е место среди наиболее часто встречающихся элементов земной коры. У некоторых живых организмов хром в очень малых количествах присутствует в ДНК (Мур, Рамамурти, 1987).

Для хрома характерно несколько степеней окисления, от Cr^{2+} до Cr^{6+} . Наиболее стабильны и распространены формы Cr(III) и Cr(VI) , последняя чаще всего представлена в составе хромат-ионов (CrO_4^{2-}) и бихромат-ионов ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Cr(VI) – сильный окислитель, в присутствии органических веществ восстанавливается до Cr(III) , окисляя их, причем в кислой среде эти процессы идут быстрее (Cervantes et al., 2001; Jor et al., 1987). В анионной форме Cr(VI) отрицательно заряжен, высокорастворим в воде и поэтому более биодоступен, чем катионная форма Cr(III) (Volland et al., 2012). Cr(III) встречается в форме оксидов, гидроксидов или сульфатов, он намного менее мобилен и в основном встречается в воде и в почве в связанном с органическими веществами виде. При избытке кислорода Cr(III) может быть окислен до Cr(VI) . В зависимости от pH среды, Cr^{6+} образует хорошо растворимые гидрохроматы (HCrO_4^-), хроматы (CrO_4^{2-}) и бихроматы ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). При нейтральном pH соединения хрома достаточно стабильны. При значениях pH выше 7.8 доминирует хромат-ион, в кислой среде хроматы превращаются в бихроматы (Cervantes et al., 2001; Jor et al., 1987).

Металлический хром поступает в окружающую среду с производств или с вулканической пылью. Трехвалентный хром имеет природное происхождение и входит в состав минералов (хромиты, крокоит и др.) наряду с кислородом и железом. Одним из основных антропогенных источников

Cr(III) являются кожевенные заводы, где хром используется для дубления кожи, поскольку образует стабильные комплексы с аминогруппами в органике (Chandra, Kulshreshtha, 2004). Соединения шестивалентного хрома (хроматы, бихроматы) чаще всего попадают в окружающую среду со сточными водами различных предприятий (Cervantes et al., 2001). В относительно незагрязненных озерах и реках уровень растворенного хрома не превышает 1-2 мкг/л, в морской воде хрома намного меньше (0.05-0.5 мкг/л) (Грушко, 1972; Wilber, Hunter, 1977). Средняя концентрация хрома в водопроводной воде составляет около 0.0023 мг/л. Кроме того, в морской воде содержится большое количество катионов, с которыми хром вступает в антагонистические взаимодействия, в результате чего его токсичность может ослабевать (Мур, Рамамурти, 1987).

В крупных реках, связанных со сбросом отходов предприятий, содержание хрома выше (до 50 мкг/л) (Wilber, Hunter, 1977). Помимо промышленных стоков, значительные количества хрома, из которых 98-99 % Cr(III), попадают в окружающую среду с коммунальными сточными водами (Мур, Рамамурти, 1987). Поступление более токсичной формы хрома Cr(VI) из антропогенных источников ограничено (около 1-2 % от общего поступления хрома), чаще он имеет природное происхождение, хорошо растворим, в пресных водах быстро восстанавливается до Cr(III) и сорбируется донными отложениями (Pfeiffer et al., 1980).

При попадании соединений хрома в водоем, в нем происходит торможение процессов минерализации, снижается численность, физиологические и морфологические показатели гидробионтов. Начиная с концентрации 0.1 мг/л, бихроматы проявляют губительное действие на водные организмы, которое, однако, сильно зависит от чувствительности разных групп гидробионтов и состава воды (Дмитриева и др., 2002).

Токсичность хрома напрямую зависит от его окислительной способности, которая у Cr(VI) выше, чем у Cr(III). Ионы металлического хрома считаются умеренно токсичными, поскольку оказывают

ингибирующее действие на тест-организмы при концентрациях 1-100 мг/л, однако хромат-ион (CrO_4^{2-}) высокотоксичен, что проявляется уже при концентрациях менее 1 мг/л (Алексеев, 2008). Соединения трехвалентного хрома слаботоксичны и обладают низкой мутагенной активностью по сравнению с соединениями шестивалентного хрома, среди которых бихроматы более токсичны, чем хроматы.

Принцип действия хрома Cr(VI) на живые организмы связан с процессом его превращения в Cr(III) , во время которого образуются свободные радикалы. Было показано, что важной составляющей токсичности Cr(VI) является переходная форма Cr(V) , образующаяся также в процессе восстановления хрома при помощи физиологических веществ-восстановителей NAD(P)H , FADH_2 , нескольких пентоз и глутатиона (Shi, Dalal, 1990). Неустойчивые комплексы Cr(V) вступают в реакции с H_2O_2 , в результате чего в большом количестве образуется свободный радикал $\text{OH}^\cdot$, который, помимо других токсических эффектов, способен непосредственно вызывать изменения ДНК.

Повреждения ДНК под воздействием хрома возникает, скорее всего, из-за продуктов оксидативного стресса (Wise et al., 2008), а мутагенность соединений шестивалентного хрома усиливается в связи с их способностью аккумулироваться в клетках (Бигалиев, 1977; Volland et al., 2012). Кроме того, хром отрицательно воздействует на ферментные системы организмов (Cervantes et al., 2001).

Внутриклеточный Cr(III) тоже обладает цитотоксическими свойствами. Он может связываться с фосфатными группами ДНК, влияя на репликацию и транскрипцию и вызывая мутагенез. Помимо этого, описано взаимодействие Cr(III) с карбоксильными и сульфгидрильными группами ферментов, изменяющее их структуру и свойства (Cervantes et al., 2001). Относительно невысокая токсичность Cr(III) связана с особенностями его транспорта внутрь клетки. Дело в том, что Cr(III) попадает в клетку пассивно, путем простой диффузии, что возможно только после образования

соответствующих липофильных лигандов. Что касается Cr(VI), то он, наоборот, способен легко проходить через клеточную мембрану с помощью активного транспорта с участием фосфатно-сульфатных переносчиков, которые также транспортируют анионы хрома (Chandra, Kulshreshtha, 2004).

Поскольку из-за повсеместного применения хром является одним из основных металлов-загрязнителей для окружающей среды, у микроорганизмов выработались разнообразные механизмы устойчивости к хрому, включающие биосорбцию клеточными оболочками, снижение накопления, осаждение (преципитацию) и превращение Cr(VI) в менее токсичную форму Cr(III). Результаты исследований воздействия различных форм хрома на живые организмы служат, в том числе, для решения вопросов биоремедиации, основой которой служит естественные способности живых организмов (Cervantes et al., 2001). В восстановлении загрязненных хроматами территорий большая роль отводится бактериям, главным преимуществом использования которых является низкие стоимость и энергозатраты, экологичность метода и возможность использовать природные непатогенные штаммы (Wakatsuki, 1995). Благодаря способности связывать ТМ, растения также играют важную роль в восстановлении контаминированных соединениями хрома водоемов (Cervantes et al., 2001). В загрязненных зонах накопление хрома пресноводными растениями возрастает до 50 мг/кг сухого веса, тогда как в растениях незагрязненных водоемов содержание хрома не превышает 5 мг/кг (Мур, Рамамурти, 1987). Водоросли *Scenedesmus*, *Selenastrum* и *Chlorella* эффективно удаляли Cr(III) (83-99%) в лабораторных условиях, тогда как степень удаления Cr(VI) была очень низкой (18-22 %) (Brady et al., 1994).

Влияние бихромата калия на растительные организмы

Бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) является хорошо растворимой в воде солью ярко-оранжевого цвета. В кислой среде проявляет выраженные окислительные свойства (Куриленко, 1974). В мировой практике

биотестирования бихромат-ион стандартизирован как эталонное соединения для оценки качества пресной и морской воды (ГОСТ Р 54496-2011; ISO-8692; OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006). Токсичность другой соли шестивалентного хрома - хромата калия (CrO_4^{2-}) - соизмерима с токсичностью бихромата у высокочувствительных организмов (Wang, 1987; Jor et al., 1987).

В связи с тем, что бихромат калия достаточно распространен в качестве загрязняющего вещества, а также широко применяется в токсикологии, накоплен богатый материал о чувствительности к этому веществу различных организмов, в том числе и растительных. Токсический эффект бихромата калия для растений зависит от многих факторов (концентрации, биодоступности, присутствия в питательном растворе хелатообразователей и других ТМ, от pH раствора) и связан с быстрой индукцией АФК и нарушением гомеостаза железа в клетках, приводящим к серьезным нарушениям.

В исследованиях на конкретных растительных объектах особенно важно не только определить действующие концентрации бихромата калия, но и установить, сколько металла может поглотить растение, как хром взаимодействует с клетками, какие эффекты в них вызывает и где накапливается. Это особенно важно в связи с масштабной экологической ролью растительных организмов.

Токсический эффект бихромата калия носит комплексный характер и зависит в первую очередь от концентрации действующего вещества. Рост водных растений обычно прекращается при 0.5-5 мг/л Cr^{6+} , но низкие концентрации хрома могут оказывать стимулирующее действие, усиливая рост высших растений и увеличивая численность клеток водорослей (Мур, Рамамурти, 1987; Дмитриева и др., 2002). Подавление роста зеленых водорослей в некоторых случаях наблюдается уже при 0.001-0.01 мг/л бихромата калия (Артюхова и др., 1996, Прохоцкая, 2000). Высшие водные растения более устойчивы к действию шестивалентного хрома - снижение

биомассы ряски *Lemna minor* на 50 % (ЛК₅₀) происходило за 4 суток в присутствии 10 мг/л шестивалентного хрома (Wang, 1987) и в течение 14 суток при воздействии 5 мг/л (Bassi et al., 1990). Токсическое действие хрома (VI) на кувшинку *Nymphaea alba* проявлялось при его концентрации 1 мМ и выражалось снижением активности нитрат-редуктазы, уменьшением общего содержания хлорофилла и белка (Vajpayee et al., 2000).

На рост водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* (сем. Selenastraceae) бихромат калия, начиная с концентрации 1 мг/л, оказывал выраженный ингибирующий эффект, который усиливался со временем (Labra et al., 2010). Увеличение концентрации бихромата калия до 2.5 и 5 мг/л приводило к нарушению целостности мембраны и снижению активности клеточного метаболизма. Кроме того, проявлялся генотоксический эффект, причем мутагенные свойства бихромата калия напрямую зависели от его концентрации. Органические токсиканты три- и тетрахлоэтилен усиливали токсический эффект, вызывая повреждение клеточной мембраны, что способствовало поступлению хрома внутрь клетки.

В культуре *Monoraphidium convolutum* полное ингибирование роста наступало при добавлении бихромата калия в концентрациях, превышающих 5 мг/л, а при действии более низких концентраций численность клеток в культуре продолжала увеличиваться, хотя при 0.5 и 1 мг/л была ниже, чем в контроле. При исходной плотности клеток 1 млн кл/мл ЛК₅₀ за 48 часов составила 5.38 ± 0.72 мг/л (Takami et al., 2012). Предположительно, одним из лимитирующих факторов в процессе деления клеток водорослей является биосинтез хлорофилла. Уже при концентрации 1 мг/л на 2 сутки эксперимента отчетливо снижалось соотношение хлорофилл а/белок, что также выражалось в обесцвечивании клеток. В клетках *M. convolutum*, подвергшихся воздействию бихромата калия, включалось сразу несколько антиоксидантных систем, образование глутатиона и антиоксидантных ферментов глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы значительно увеличивалось, начиная с концентрации 1 мг/л. Таким образом, токсичность

бихромат-иона связана с дисбалансом окислительно-восстановительных процессов в хлоропластах. У одноклеточной водоросли *M. convolutum* ферменты антиоксидантной системы способны поддерживать нормальное функционирование клеток и работу фотосинтетического аппарата при концентрациях бихромат-иона, не превышающих 1 мг/л.

Для одноклеточной подвижной пресноводной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. концентрации бихромата калия 1-15 мг/л были сублетальными, а свыше 30 мг/л – летальными. Токсичность бихромата калия у *Ch. reinhardtii* проявлялась в изменении скорости движения и количестве подвижных клеток, в снижении или, наоборот, увеличении энергозатрат, необходимых для осуществления движения, и в значительной степени зависела от концентрации и от продолжительности контакта с токсикантом (Новикова и др., 2008). Детальное изучение влияния бихромата калия на тилакоиды и светочувствительный глазок *Ch. reinhardtii* проводили в другой работе (Rodríguez et al., 2007). У клеток, обработанных 1 и 5 μM , сохранялись морфология и пигментация глазка, однако при острых концентрациях бихромат-иона, превышавших 10 μM , клетки становились неподвижными и обесцвечивались, фототаксис утрачивался, наблюдалось потемнение светочувствительного глазка. С помощью микроспектроскопии было выявлено, что хлорофилл а и b в хлоропластах превращался в феофитин а и b, соответственно. У обработанных бихроматом калия клеток *Ch. reinhardtii* происходил сдвиг максимума поглощения светочувствительного глазка в сторону более длинных волн. Это может указывать на преобладание нециклических каротиноидов, таких как ликопин и бета-каротин. Из-за обилия ненасыщенных жирных кислот, тилакоидные липиды особенно восприимчивы к оксидативному повреждению. Реактивные формы кислорода, атакуя эти липиды, инициирует радикальные цепные реакции, которые в конечном итоге могут разрушить мембрану тилакоидов путем повреждения находящихся в ней структурных пигмент-белковых комплексов.

У пресноводной микроводоросли семейства десмидиевых *Micrasterias denticulata* бихромат калия в концентрации 1mM за 4 часа ингибировал развитие клеток и замедлял скорость их деления. Большинство клеток оставались живыми (95.33 %), но не могли полноценноделиться и сформировать вторую половину клетки, а при переносе в чистую среду восстанавливали нормальный внешний вид и скорость роста. В таких клетках диктиосомы частично инволютировались из-за снижения секреторной активности, в некоторых участках клеточной стенки появлялись утолщения с темными включениями, митохондрии увеличивались в размерах и в большом количестве появлялись мелкие вакуоли с электронноплотным содержимым. В течение 3-недельной интоксикации 10 μ M бихромата калия клетки *M. denticulata* переставали делиться, поэтому их форма не изменялась, но хлоропласт конденсировался и темнел, по краям появлялись вакуоли. Хроническая интоксикация приводила к практически полному ингибированию электронного транспорта в фотосистеме II и к значительному снижению содержания хлорофилла, а также к серьезным нарушениям ультраструктуры хлоропластов (увеличивалось количество крахмальных зерен, тилакоиды растягивались, граны становились незаметными). Хром обнаруживался внутри клеток и был локализован вдоль внутренней стороны клеточной стенки в виде скоплений темных гранул, окруженных пузырьком и формирующих мешковидную структуру. Активность каталазы и супероксиддисмутазы после воздействия бихромата калия не изменялась, а пул глутатиона в клетках *M. denticulata* значительно снижался, что говорит о том, что глутатион играет основную роль при детоксикации АФК, вызванных действием хрома (Volland et al., 2012).

Бихромат калия способен влиять на клеточный цикл водорослей, вызывая сильные изменения в протекании отдельных стадий. При действии сублетальной концентрации бихромата калия в популяции *P. subcapitata* преобладали крупные клетки с 1 ядром, что, скорее всего, обусловлено проявлением ингибирующего эффекта еще до первого деления ядра

(Machado, Soares, 2014). Также сублетальные концентрации бихромата калия ингибировали деление клеток *S. quadricauda* в пресинтетическом периоде (на стадии *G1* клеточного цикла), а летальные концентрации вызывали гибель зрелых клеток уже в конце постсинтетического периода (фазы *G2*) или при митозе (Прохоцкая, 2000).

Хром, как и некоторые другие металлы, способен изменять объемы клеток даже в слаботоксичных концентрациях. При воздействии бихромата калия на микроводоросль *Pseudokirchneriella subcapitata* в течение 72 часов в концентрациях ЛК₁₀ и ЛК₅₀, объем клеток уменьшался по сравнению с контролем, а при концентрации ЛК₉₀, когда рост численности клеток отсутствовал, клетки увеличивались в объеме (Machado, Soares, 2014). Прохоцкой В. Ю. (Прохоцкая, 2000) был получен противоположный результат изменения размеров *S. quadricauda* в условиях интоксикации бихроматом калия. В присутствии сублетальных концентраций популяция была в основном представлена клетками крупных размеров, среди которых появлялись особые, «гигантские» клетки, тогда как при летальных концентрациях (10 мг/л и выше), наоборот, появлялись «мелкие» клетки. Такая же реакция культуры наблюдалась и при воздействии на нее сульфата имазапила. Появление в большом количестве клеток с увеличенными размерами было вызвано торможением процессов деления. Такой эффект от воздействия токсиканта отмечают также ряд других авторов (Марушкина, 2005; Бойчук, 2007). Крупные клетки сохранялись при росте в чистой среде после интоксикации бихроматом калия в концентрации 3-10 мг/л (Артюхова и др., 1996), в то время как изменения, происходившие с клетками в присутствии сульфата имазапила, носили обратимый характер. Скорее всего, в среде с бихроматом калия размеры клеток либо закреплялись генетически, либо действие хрома, накопленного клетками в процессе интоксикации, продолжалось и после. При действии остротоксичных концентраций бихромата калия в популяции появлялись более мелкие клетки, которые вероятнее всего являются потомством наиболее резистентных клеток, и,

благодаря усиленному синтезу полинуклеотидов и энергозапасяющих веществ, быстрее делятся и не успевают увеличиваться в размерах (Артюхова и др., 1996; Прохоцкая, 2000).

Эффект от воздействия бихромата калия также зависит от сезона и физиологической активности организма. Так, культура хлорококковой микроводоросли *S. quadricauda* была наиболее чувствительной к бихромату калия в зимний период, а летом и в осенний период, наоборот, повышалась ее устойчивость (Артюхова и др., 1997).

1.4.2. Серебро: свойства, формы, нахождение в природе и биологические эффекты

Серебро (химическое обозначение Ag) – это мягкий и пластичный светлый металл с плотностью 10.5 г/см³, температурой плавления 960.8°C и температурой кипения 2163°C. Серебро, как и большинство известных солей этого металла, практически нерастворимы в воде (растворимость серебра в морской воде составляет около 0.04 мкг/л). Химически серебро малоактивно, в естественных условиях представлено стабильными изотопами ¹⁰⁷Ag и ¹⁰⁹Ag (Куриленко, 1974).

В природе серебро встречается в составе руд в виде нерастворимых или мало растворимых в воде солей либо в самородном виде (Грушко, 1972). Отмечено достаточно высокое содержание серебра в подземных водах, куда оно попадает в основном с отходами производства и фотохимических процессов и стоками горно-обогатительных предприятий. В сточных водах серебро может присутствовать как в растворенном (ионная форма, Ag⁺), так и во взвешенном (коллоидном) состоянии, в виде наночастиц серебра (далее - AgНЧ) (Blaser et al., 2008).

В фильтрованной природной воде AgНЧ с карбонатным покрытием с течением времени агломерировались (Piccaripetra et al., 2012b). Присутствие гуминовых кислот стабилизирует AgНЧ, что позволяет им длительное время находиться в водных экосистемах. Кроме того, гуминовые кислоты

потенциально могут привести к увеличению биодоступности AgHCl (Cumberland, Lead, 2009).

О влиянии ионного серебра на водные организмы, в том числе на водоросли, накоплено достаточно информации. Известно, что токсичность ионного серебра превышает токсичность раствора AgHCl в 10-100 раз для различных водных организмов, таких как ракообразные (Völker et al., 2013), высшие растения (Gubbins et al., 2011) и водоросли (Navarro et al., 2008a). Ион серебра высокотоксичен, его токсичность для тест-организмов проявляется при концентрациях до 1 мг/л (Алексеев, 2008), но он также способен оказывать токсическое действие на водные организмы даже в наномолярных концентрациях (Lee et al., 2005). Токсичность серебра почти наверняка связана с его внутриклеточным накоплением, а не с адсорбцией на поверхности клеток (Ratte, 1999). Коэффициент бионакопления ионного серебра водорослями достаточно высокий (более 104). Было показано, что зеленая водоросль *C. reinhardtii* очень быстро поглощала Ag^+ , и, возможно, при помощи Cu(I) -транспортной системы (Fortin, Campbell, 2000).

Серебро является универсальным антисептическим средством против бактерий, грибов и вирусов. Однако механизм его действия до конца не изучен. Предположительно, серебро угнетает функцию жизненно важного для многих патогенных микроорганизмов фермента (Бернавски, 2006; Крутяков и др., 2008). Уже в Древнем мире было известно о бактерицидных свойствах серебра, которое применяли еще до нашей эры в Индии и Персии для хранения и обеззараживания воды, а в Древнем Египте серебряные пластины прикладывали к ранам для их лучшего заживления. Примерно с IV века серебро стали использовать для изготовления посуды. Издревле известно о целебных свойствах воды индийской реки Ганг, излечивающей людей от кожных болезней и способствующей быстрому заживлению ран. Эти свойства воды объясняются высоким содержанием ионов серебра, которое получается в результате взаимодействия природных электрических токов земной коры с грунтовыми водами, омывающие значительные в этой

местности месторождения серебра. При действии солнечного света ионное серебро переходит в металлическую форму и оседает на дно, поэтому наибольший лечебный эффект в реке наблюдается в темное время суток, особенно – перед рассветом (Таранов, Филиппова, 2007). В современном мире так называемая «серебряная вода» получила широкое применение в 30е годы XX века. До 1938 года в США водные суспензии металлического серебра повсеместно назначали в качестве антибактериального препарата как наружно, так и путем внутривенных и внутримышечных инъекций, однако потом наступил длительный период, когда серебро официально не применяли в медицинских целях. Производство коллоидного серебра было возобновлено в 1970х годах, в то же время была проведена серия медицинских исследований с участием серебра (Бернавски, 2006). Токсический эффект проявлялся из-за того, что металлические частицы в коллоидном растворе постепенно превращались в ионы серебра, которые губительно действовали на патогенные микроорганизмы. Причем такие растворы сохранялись в жидких средах организма неизменными в течение некоторого времени, процесс образования ионов шел достаточно медленно, благодаря чему серебро в организме оказывало продолжительное бактерицидное действие, не повреждая при этом ткани. В настоящее время серебро в виде коллоидных растворов достаточно распространено в качестве биологически активной добавки в пищу, рекомендованной для приема внутрь. Также серебро добавляют в различные наружные медицинские средства (мази, глазные капли, перевязочные материалы).

Позже была показана важность именно коллоидного состояния раствора серебра для поддержания его бактерицидных свойств. Существует много различных способов получения коллоидного серебра. В настоящее время для производства медицинского раствора наилучшего качества применяют электротехнологии. Второй метод, используемый в настоящее время – это метод дробления, который, однако, менее предпочтителен, поскольку не всегда может гарантировать образование частиц маленького

размера, способных поддерживать коллоидное состояние раствора. Для стабилизации коллоида могут использовать стабилизирующие вещества, например белок, однако лечебные свойства такого раствора уже ниже (Бернавски, 2006; Крутяков и др., 2008).

Особенно перспективными в вопросах борьбы с бактериями считаются наночастицы серебра, которые рассматриваются как особый класс бактерицидных средств. При уменьшении размера наночастиц серебра увеличивается их удельная поверхность, благодаря чему усиливается бактерицидный эффект, который особенно выражен при индивидуальном размере наночастиц менее 10 нм. Кроме того, в качестве антибактериального агента серебро привлекательно еще и тем, что микроорганизмы не формируют к нему привыкания (Rai et al., 2009). AgНЧ сильно изменяют структуру бактериальной мембраны, увеличивая ее проницаемость, а проникнув внутрь клетки, связываются с ДНК, создавая серьезную помеху ее нормальному функционированию и репликации. Таким образом, наиболее токсичны частицы серебра размером 1-10 нм, но, к сожалению, в силу таких маленьких размеров они цитотоксичны и для клеток человека, что сильно ограничивает их применение (Sondi, Salopek-Sondi, 2004).

В связи с увеличением использования человеком различных форм серебра, особенно в виде наночастиц (далее - AgНЧ), в фармакологии, пищевой промышленности и в бытовых целях (производство текстильных изделий, косметики и др. товаров потребления), оно становится не только средством подавления роста вредоносной микрофлоры, но и возможным компонентом загрязнения вод, создавая потенциальный риск для водных организмов и экосистем в целом. По данным Проекта развития нанотехнологий, серебро является одним из наиболее часто применяемых наноматериалов, его НЧ входят в состав более чем 250 продуктов потребления (www.nanotechproject.org). Так, при стирке тканей, содержащих AgНЧ, высвобождается значительное количество серебра как в ионной форме, так и в виде наночастиц. Причем использование отбеливателей может

только ускорить этот процесс (Geranio et al., 2009). Биоцидные пластмассы и ткани, по прогнозам, могут служить источником около 15 % всего попадающего в среду серебра (Blaser et al., 2008). Сообщается об определении отдельных или агломерированных AgНЧ в природных пресных водах (Chinnapongse et al., 2011; Piccapietra et al., 2012b). Кроме того, AgНЧ со временем растворяются, в результате чего образуется свободное серебро Ag^+ , один из наиболее токсичных металлов для микроорганизмов (Ratte, 1999). Точно неизвестно, в какой концентрации серебро присутствует в окружающей среде. По прогнозам, основанным на изучении моделей экологического воздействия НЧ, ожидаемая концентрация AgНЧ в сточных водах составляет 33-111 нг/л (Gottschalk et al., 2009), в природных водах - около 0.03 мкг/л (30 нг/л) (Mueller, Nowack, 2008). В поверхностных водах потенциально содержится до 0.1 мг/л AgНЧ, в донных отложениях - до 2.9 мг/кг (Handy et al., 2008).

Особенности воздействия наночастиц серебра на растительные организмы

На основании данных последних мировых исследований наноразмерные материалы предлагают рассматривать как отдельный класс веществ. В наноразмерном состоянии любые вещества приобретают новые химические, физические и биологические свойства, существенно отличающиеся от их свойств в макрообъемном состоянии (Wise et al., 2010), и поэтому они могут быть потенциально токсичными для живых организмов. Остается много нерешенных вопросов относительно биодоступности, поглощения организмами, механизмов токсичности наноматериалов, их взаимодействия с различными химическими веществами и биодоступности при попадании в водоемы (Navarro et al., 2008b).

Существенное значение имеют свойства поверхности наночастиц, т.к. от этого зависит их способность к агрегации, подвижность в водных экосистемах и взаимодействие с живыми организмами. Абиотические

факторы окружающей среды, например, природные органические вещества и другие загрязнители, взаимодействуя с искусственными наночастицами, могут как усиливать их биодоступность, так и ослаблять ее в случае возрастающей агрегации (Navarro et al., 2008b). Повышение концентрации наночастиц может приводить к увеличению степени агрегации, вследствие чего токсичность будет уменьшаться. Большая удельная площадь поверхности AgНЧ увеличивает область их контакта с бактериями и вирусами, что позволяет снизить концентрацию серебра с сохранением противомикробных свойств (Wise et al., 2010).

Водные организмы могут быть подвержены действию дискретных или агломерированных AgНЧ (Piccapietra et al., 2012a). Помимо непосредственного взаимодействия AgНЧ с клетками организмов, токсичность их раствора обусловлена растворением наночастиц и образованием свободного иона серебра (Ag^+) (Navarro et al., 2008a; Piccapietra et al., 2012a). Как было показано, токсичность раствора AgНЧ может со временем повышаться за счет увеличения концентрации свободного серебра (Ag^+), отделяющегося от AgНЧ (Gubbins et al., 2011). Есть данные, что в растворе с AgНЧ за 48 часов образуется около 1-2% Ag^+ (Navarro et al., 2008a; Völker et al., 2013). Процесс образования свободного серебра из AgНЧ может стимулироваться присутствием в питательном растворе растений, которые поглощают AgНЧ (Navarro et al., 2008a. Gubbins et al., 2011).

Сравнительно небольшое число исследований посвящено изучению взаимодействия наночастиц серебра AgНЧ с растительными водными организмами. Было показано, что AgНЧ размером 10 – 15 нм вызывали существенные изменения роста и морфологии клеток многоклеточных зеленых водорослей *Pithophora oedogonia* and *Chara vulgaris* (Dash et al., 2012). В зависимости от дозы, происходило также снижение содержания пигментов и обесцвечивание нитей, утончение и разрыв клеточной стенки, хромосомные аномалии и необратимые генетические нарушения. Исследовали влияние AgНЧ на зеленую водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*

(Navarro et al., 2008a) и прибрежную морскую диатомовую водоросль *Thalassiosira weissflogii* (Miao et al., 2009). В обоих случаях токсичность AgНЧ была главным образом обусловлена присутствием свободных ионов серебра в клетке. Внутриклеточное накопление AgНЧ было отмечено у пресноводной водоросли *Ochromonas danica* (Miao et al., 2010) и у высшего водного растения *Lemna gibba* (Oukarroum et al., 2013). Шестичасовая экспозиция *C. reinhardtii* в присутствии AgНЧ приводила к изменению процесса фотосинтеза и уменьшению квантового выхода фотосистемы II, что было вызвано, по мнению авторов, токсичностью высвобождаемых ионов серебра (Navarro et al., 2008a). Подобный эффект (уменьшение квантового выхода ФСII, снижение содержания хлорофилла а и снижение скорости роста) у *Thalassiosira weissflogiie* другие исследователи также связывают с образованием ионов серебра (Miao et al., 2009). У микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella tertiolecta* накопление AgНЧ приводило к уменьшению содержания хлорофилла, повышению образование реактивных форм кислорода (ROS) и усилению перекисного окисления липидов (Oukarroum et al., 2012).

Внутриклеточное накопление Ag^+ при воздействии AgНЧ с карбонатным покрытием (средний диаметр 29 нм) и нитрата серебра (20–500 нм) изучено у штамма дикого типа и у лишённого клеточной стенки мутанта зеленой водоросли *C. reinhardtii* (Piccapietra et al., 2012a). Биодоступность AgНЧ была низкой у обоих штаммов по сравнению с доступностью Ag^+ из $AgNO_3$. Клеточная стенка выполняет защитную функцию в ограничении поступления Ag^+ в клетку. Показано, что содержание Ag^+ внутри клеток возрастало с увеличением времени экспозиции и концентрации AgНЧ и $AgNO_3$. При воздействии нитрата серебра уровень внутриклеточного серебра линейно повышался, а при воздействии наночастицами его устойчивая концентрация достигалась примерно в течение 10 минут, после чего уровень Ag^+ в клетке оставался примерно на одном уровне. Авторы связывают это с образованием наночастицами комплексов с цистеином, которые клетка уже

не может поглотить. Клеточная стенка позволяла вдвое снизить поглощение серебра.

Токсичность AgНЧ для представителей высшей водной растительности, видов рода ряска проявлялась в концентрации в концентрации 0.1, 1 и 10 мг/л у *Lemna gibba* (Oukarroum et al., 2013) и начиная с 5 мкг/л у *Lemna minor* (Gubbins et al., 2011). Токсический эффект AgНЧ у *Lemna gibba* проявлялся в значительном снижении жизнеспособности клеток ряски (Oukarroum et al., 2013), при повышении концентрации серебра в среде увеличивалось его поглощение клетками. Для *Lemna minor* (Gubbins et al., 2011) наблюдалась линейная зависимость «доза-эффект» после 14 суток воздействия. Токсичность (цитотоксичность) AgНЧ у ряски *Lemna gibba* связывают с растворенным свободным серебром, которое высвобождается из наночастиц в клетках растения и вызывало образование внутриклеточных форм активного кислорода, что приводило к сильному оксидативному стрессу и нарушало в результате биохимические процессы в клетке (Oukarroum et al., 2013).

Механизм действия коллоидного серебра на растительную клетку до конца не изучен. Предложены две гипотезы возможного частичного поступления AgНЧ в клетку водорослей, основанные на сравнении размера наночастиц и размера пор клеточной стенки (5–20 нм) (Navarro et al., 2008b) и эндоцитозном поглощении AgНЧ через клеточную мембрану (интернализация) (Moore, 2006). Показано, что многие наноматериалы индуцируют в клетках водорослей сильный окислительный стресс, нарушающий баланс между оксидантными и антиоксидантными процессами (Klaine et al., 2008; Hu et al., 2009). В присутствии AgНЧ может происходить увеличение уровня АФК, повреждающих белки и ДНК и вызывающих перекисное окисление липидов (De Lima et al., 2012). В зависимости от силы окислительного стресса клетки могут погибнуть в результате апоптоза или некроза. Цитотоксический эффект AgНЧ , вызывающих окислительный стресс, может быть результатом взаимодействия ионов серебра с

функциональными тиоловыми группами (-SH), поскольку ионы серебра имеют высокое сродство к ним (Szivák et al., 2009). Помимо этого, частицы серебра адсорбируются на клеточной стенке, что также неблагоприятно для жизни водоросли (Dash et al., 2012).

Водоросли секретируют вещества, которые могут изменять токсичность наночастиц и свободных ионов, а также уменьшать скорость растворения металлов из наночастиц. Кроме того, выделяемые водорослями вещества могут приводить к слипанию наночастиц или хелатированию ионов металлов, таким образом снижая их биодоступность (Soldo et al., 2005). Как было показано на примере морской диатомеи *Thalassiosira weissflogii*, в присутствии AgНЧ у водорослей возрастает образование богатых полисахаридами экзополимерных веществ, что может также способствовать детоксификации (Miao et al., 2009). Уровень этих полисахаридов повышался при добавлении серебра и был в целом выше у клеток, толерантных к серебру.

Поведение AgНЧ в жидкой среде зависит от ионной силы раствора – при высоких значениях этого показателя агрегация частиц усиливается, что может приводить к увеличению их размеров в 7-8 раз (Gubbins et al., 2011; Cumberland, Lead, 2009). В синтетических питательных средах агрегация частиц усиливалась с увеличением концентрации ионов Na^+ и Ca^+ , а также при изменении pH среды (повышении или понижении), что вызывало изменение заряда поверхности наночастиц на противоположный (Cumberland, Lead, 2009; Piccapietra et al., 2012b).

1.5. Адаптация микроводорослей к тяжелым металлам

Адаптация является одним из фундаментальных свойств живых организмов, поскольку обеспечивает нормальное развитие и функционирование в условиях колебания привычных экологических факторов в пределах нормы реакции и способствует выживанию. Чем лучше адаптирован организм к конкретному фактору, тем он устойчивее к его

колебаниям. Жизнеспособность организма определяется его общей системой устойчивости к многочисленным факторам окружающей среды. Среди абиотических факторов различают воздействия физической (температура, свет, ультрафиолетовое излучение, радиация, ветер, давление, течение воды и др.) и химической природы (металлы, пестициды, фунгициды и другие химические загрязнители) (Ипатова, 2013).

При изучении адаптации одноклеточных водорослей имеют дело с популяцией, а не с отдельными организмами. Важнейшей характеристикой популяции, лежащей в основе отбора, является ее генотипическая гетерогенность. В популяции практически всегда присутствуют мутантные особи, которые оказываются более резистентными и при отклонении условий от нормы реакции популяция выживает именно за счет них, после чего такой мутант начинает доминировать. Генетическая гетерогенность популяции определяет ее надежность.

Также внутри популяции существует фенотипическая гетерогенность, которая реализуется благодаря разнообразию особей на разных стадиях жизненного цикла. Так, покоящиеся клетки есть во всех популяциях микроводорослей. Они являются структурным резервом популяции. Клетки в состоянии покоя могут не размножаться неопределенно долгое время и полностью сохранять при этом способность к пролиферации и жизнеспособность. Они обладают большей резистентностью, чем пролиферирующие клетки. Бионты, или самостоятельные морфоструктуры в цикле развития водорослей, являются приспособлением к использованию благоприятных и неблагоприятных условий среды. Также существует функциональный резерв, связанный с нереализуемыми метаболическими процессами в каждой клетке.

Сигналом к использованию резервов, то есть к включению систем надежности популяции, служит, скорее всего, объем синтезированных и выделенных водорослями в окружающую среду метаболитов. Чем хуже условия, тем выше процент выделяемых веществ (Гапочка, 1981).

В определенных пределах растительные организмы могут выживать в стрессовых условиях загрязнения окружающей среды в результате двух различных процессов: физиологической адаптации (акклимации), являющейся модификацией генной экспрессии, и адаптации путем естественного отбора, если мутации обеспечивают соответствующую генетическую вариабельность. Физиологическая адаптация ограничена условиями, в которых организмы обычно встречаются в естественной среде, а генетическая адаптация позволяет преодолевать экстремальные условия окружающей среды (Hoffmann, Parsons, 1993). Например, на уровне популяций адаптация микроводорослей *S. quadricauda* и *Thalassiosira weissflogii* к хрому и антибиотику стрептомицину происходила в результате отбора резистентных к ним клеток. Токсиканты убивали чувствительные клетки дикого типа, но резистентные мутантные клетки в это время оставались живыми (Ипатова, 2013). Оцененная с помощью флуктуационного теста Лурия–Дельбрюк мутационная скорость для *S. quadricauda* и *T. weissflogii* составляла, соответственно, 5.2×10^{-6} и 3.1×10^{-6} мутантов (в расчете на одно клеточное деление), резистентных к хрому, и была сопоставима со значениями скоростей спонтанных мутаций, оцененных разными авторами при изучении устойчивости других видов водорослей к ряду токсикантов, но оказалась на два порядка выше, чем у бактерий (Ипатова и др., 2012; Lopez-Rodas et al., 2001). Периодическое появление редких спонтанных преселективных мутаций дает возможность таким популяциям выживать при загрязнении окружающей среды. Но темп спонтанных мутаций у различных организмов от бактерий до человека чрезвычайно низок и значительно варьирует у разных видов и от гена к гену внутри вида. Повышенная по сравнению с бактериями скорость появления резистентных к металлам мутантов (в результате спонтанных мутаций) у микроводорослей может гарантировать их выживание при токсических уровнях загрязнения окружающей среды при условии, если размер популяции микроводорослей будет достаточно большим.

Растительные организмы имеют развитые стратегии и механизмы защиты от избытка металлов в среде на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях организации. Микроводоросли могут выживать в среде, загрязненной ТМ, благодаря внутренним и/или внешним механизмам детоксикации (di Torri et al., 2008), выработанных в процессе эволюции для приспособления к повышенным концентрациям металлов. Увеличение продукции внеклеточных хелаторов в ответ на присутствие ТМ, а также иммобилизация металла путем связывания на поверхности клетки или с помощью слизи – это примеры внешних механизмов толерантности, которые приводят к уменьшению попадания металлов внутрь клеток. Комплекса́ция металлов с небелковыми тиоловыми соединениями, накопление ТМ в полифосфатных тельцах, выведение металлов из клетки – это примеры внутриклеточных механизмов детоксикации металлов. Главная цель этих стратегий, которые могут действовать отдельно или вместе, – защитить чувствительные мишени клетки (ДНК, белки) от воздействия избытка металлов. В слабо загрязненной среде виды микроводорослей выживают в результате физиологической адаптации. При низком уровне загрязнения вызванные им эффекты могут быть скомпенсированы.

Устойчивость водорослей к загрязнению ТМ во многом зависит от защитных реакций, способных предотвратить окислительный удар (Pinto et al., 2003). При низких концентрациях, имеющих хроническое токсическое действие, водоросли накапливают ТМ и могут передавать их далее по трофической цепи другим организмам. Хроническая интоксикация ТМ приводит к нарушению окислительного баланса хлоропластов и вызывает в них усиление активности антиоксидантных ферментов. Однако в условиях острой токсичности, ТМ и другие загрязнители нарушают систему антиоксидантной защиты, что приводит к гибели клетки или к остановке работы всего клеточного аппарата и проявляется, например, как образование цист у динофлагеллят.

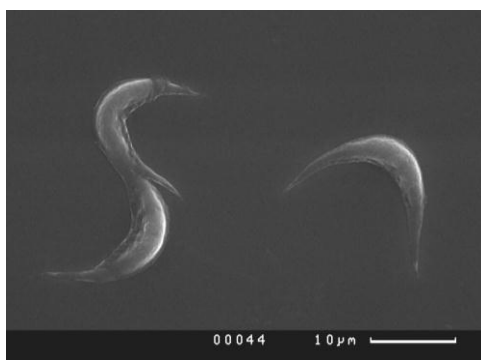
Ингибирование роста и хлороз (обесцвечивание)— это типичные и наиболее распространенные симптомы фитотоксичности металлов для многих растительных организмов, у которых фотосинтез является наиболее чувствительным процессом в обмене веществ. Было показано, что поддержание высокого антиоксидантного статуса хлоропластов является важным механизмом в акклимации *Gonyaulax polyedra* к хроническому загрязнению металлами. Работая на внутриклеточном сайте, на который действует оксидативный стресс, индукция таких хлоропластных антиоксидантов может иметь решающее значение для выживания клеток в условиях воздействия тяжелых металлов (Okamoto et al., 2001). Таким образом, возрастающая активность антиоксидантных ферментов и высокий пул глутатиона имеют важное значение в ослаблении окислительных повреждений хлоропластов (Pinto et al., 2003).

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

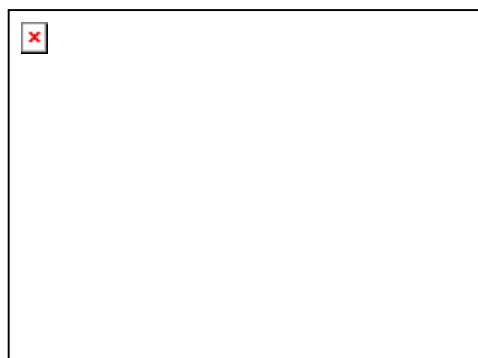
1. Объекты исследования

Объектом исследования служила культура пресноводной зеленой хлорококковой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korsh.) Hind. (морфотип), которая в настоящее время находится на депонировании в коллекции культур микроводорослей ИФР РАН им. К.А. Тимирязева (IPPAS М-2017) (Рисунок 1).

По данным литературы известно, что *M. arcuatum* - одиночная водоросль, клетки дуговидно и подкововидно изогнутые (редко - до круговидно изогнутых), постепенно суженные и заостренные на концах, без слизистого покрова (осевая длина 26 – 60 мкм, ширина – 0.8 – 4.4 мкм, расстояние между концами 20 – 50 мкм). Хроматофор ярко-зеленый, пристенный, выстилающий весь периметр клетки, не доходит до концов клетки, часто с центральным вырезом на выпуклой стороне. Пиреноид не различим в световой микроскоп. Размножается *M. arcuatum* бесполым путем, образуя 4-8 автоспор внутри материнской клетки, которые выходят при разрыве ее оболочки (Царенко, 1990). Близкородственные виды используются в биотестировании в ряде зарубежных стран (Hsieh et al, 2006; ISO-8692; OECD guidelines for the testing of chemicals ..., 2006).



Monoraphidium arcuatum



Scenedesmus quadricauda

Рисунок 1. Клетки *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* (фото автора)

Для оценки *M. arcuatum* как потенциального тест-объекта в биотестировании, в качестве контроля была выбрана культура хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.), которая на протяжении многих лет используется в отечественной практике биотестирования (Жмур, Орлова, 2007; ГОСТ Р 54496-2011; Методические указания..., 2011; РД 118-02-90). На кафедре гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова накоплен богатый материал о развитии культуры *S. quadricauda*, морфологии ее клеток, физиологической и структурной гетерогенности, о взаимодействии с токсичными веществами (Дмитриева и др., 1992; Артюхова и др., 2000; Прохоцкая, 2000).

S. quadricauda относится к ценобиальным хлорококковым водорослям, чаще встречаются 2- и 4-клеточные ценобии из удлинненно-овальных клеток с закругленными концами (8–36×2.1–12 мкм). Краевые клетки одного ценобия имеют по два отогнутых наружу шипа. При размножении в материнской клетке образуются 2-4 автоспоры, которые при выходе слагаются в ценобии (Царенко, 1990). Культура получена из коллекции культур водорослей кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова (DMMSU, штамм S-3) (Рисунок 1).

2. Выделение *M. arcuatum* в альгологически чистую культуру

Клетки *M. arcuatum* выделяли из пробы фитопланктона, отобранного в летний период 2008 года из р. Москва. Первоначально получали накопительную поликультуру: 50 мл воды пропускали через мембранный фильтр № 5, клетки отмывали дистиллированной водой, полученный осадок переносили в жидкую питательную среду Успенского №1 и подращивали в люминостате. В получении и поддержании накопительной культуры в период 2008 – 2009 гг. также принимали участие Дмитриева А. Г., Коломенская Е. Е., Ипатова В. И. В дальнейшем автор наносила накопительную культуру на поверхность агаризованной среды (1.8-2.0 % агара) разными способами, приведенными в монографии Андреевой В. М.

(Андреева, 1998). Среди них был широко применяемый в микробиологии метод последовательного разбавления, согласно которому исходную культуру разбавляют до такой концентрации, чтобы можно было получить единичные колонии, сформированные одной клеткой. Также было опробовано выделение культуры с помощью другого метода, когда по поверхности агаризованной среды равномерно распределяли около 0.3 мл стерильной дистиллированной воды, а в центр чашки Петри вносили каплю накопительной культуры. Кроме того, был испробован микровегетационный альгологический метод нанесения капли разбавленной накопительной культуры на мембранный фильтр, помещенный в центр чашки Петри с агаризованной питательной средой. После образования видимых глазом колоний, те из них, которые состояли из клеток *M. arcuatum* и были свободны от сопутствующих грибов и бактерий, посевной иглой переносили в жидкую питательную среду Успенского №1. Исследование роста культуры начали в 2010 году через 5 месяцев предварительного культивирования с учетом периода адаптации к лабораторным условиям.

3. Условия культивирования и проведения экспериментов

Опытные и контрольные культуры обоих видов выращивали на среде Успенского №1, которая пригодна для выращивания микроводорослей, обитающих в водах средней степени загрязненности органическими веществами.

Исходные растворы солей, входящих в состав среды, готовили отдельно с учетом заданных концентраций (Таблица 1). Для приготовления 1000 мл среды, в дистиллированную воду (1000 мл) добавляли по 1 мл исходного раствора каждой соли, после чего 30 минут стерилизовали кипячением на медленном огне. В остывшую среду вносили 1 мл 1 %-ного раствора цитрата железа ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Ионная сила готового питательного раствора составляла примерно 0.0209 %, pH – 7.0-7.3. Растворы для культуральных сред готовили из солей фирмы «Реахим» марки хч.

Таблица 1. Состав среды Успенского №1

Реактивы		Содержание (г/л)	
		в среде	в исходном растворе
1.	KNO ₃	0.025	25
2.	MgSO ₄	0.025	25
3.	Ca(NO ₃) ₂	0.1	100
4.	KH ₂ PO ₄	0.025	25
5.	K ₂ CO ₃	0.0345	34.5

В конические колбы объемом 150 мл вносили по 50 мл среды с клетками водорослей, а в цилиндрические сосуды малого объема (флаконы) - 10 мл среды. Водоросли выращивали в люминостате с досвечиванием лампами дневного света со сменой дня и ночи (12/12 часов), освещенностью 3-5 тыс. люкс и температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Содержимое емкостей перемешивали 2 раза в сутки для улучшения газообмена, уменьшения оседания клеток и прилипания их к стенкам сосуда (ГОСТ Р 54496-2011).

Культуру водорослей пересевали на свежую питательную среду не реже, чем раз в 2 недели и выращивали только в стерильной посуде.

Для опытов использовали культуру водорослей в фазе логарифмического роста (4-7 суток), с исходной плотностью 20, 50 и 80 тыс. кл/мл и содержащую не менее 95% живых клеток.

В эксперименты брали только синхронизированные культуры. Для синхронизации культуру в течение 2-3 суток выдерживали в полной темноте при комнатной температуре. В результате старые клетки оседали на дно, а молодые оставались в верхнем слое цилиндра. Верхний слой, не перемешивая, переносили в стерильную питательную среду. Для получения дважды синхронизированной культуры процедуру синхронизации повторяли через 5-7 суток роста.

Для опытов со смешанными культурами использовали 3-7 суточные монокультуры *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в соотношении 1:1 и 9:1, чтобы общая плотность клеток составляла 50 ± 2 тыс. кл/мл.

4. Токсиканты

В качестве токсикантов были выбраны бихромат калия (хч, Реахим) и коллоидное серебро (SilverMax, Bio International, Inc., США) (Рисунок 2). Для опытов исходный концентрированный раствор токсиканта (1 мг/мл для бихромата калия и 10 мг/л для коллоидного серебра) разводили стерильной дистиллированной водой до нужной концентрации и добавляли в культуру однократно при постановке эксперимента. Их влияние оценивали в хронических экспериментах длительностью до 50 суток.

Бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) используют в качестве эталонного токсиканта для характеристики чувствительности культуры и ее пригодности для биотестирования (Международный стандарт ..., 1987; Wang, 1987). Исходный раствор ярко-оранжевого цвета.

Бихромат калия добавляли в культуру *M. arcuatum* в разных экспериментах в концентрациях 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 и 10 мг/л.

Коллоидное серебро, используемое в данной работе, рекомендовано в качестве биологически активной добавки для лечения инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной природы у человека и животных. Поэтому исследование его токсичности имеет большое практическое значение. Помимо этого, влияние коллоидного серебра на микроводоросли изучали в рамках исследования эффектов разных форм серебра на гидробионты в лаборатории водной токсикологии, где выполнялась данная работа.

Готовый раствор коллоидного серебра прозрачный, без цвета и запаха, представляет собой взвесь наночастиц серебра размером 17-33 нм, не содержит примесей и искусственных добавок. Коллоидное серебро добавляли к культурам водорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в концентрации 0.0001, 0.001, 0.01 и 0.1 мг/л.

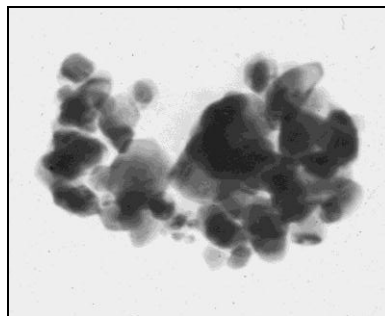


Рисунок 2. Наночастицы серебра в растворе (17-33 нм)

Было исследовано изменение токсичности питательной среды в процессе развития водорослей при интоксикации и в норме. Для этого культуру микроводорослей на разные сутки роста фильтровали через мембранный фильтр (размер пор 0.45 мкм) с помощью водоструйного насоса. Токсичность полученных бесклеточных фильтратов оценивали методом биотестирования с использованием в качестве тест-объекта молодой интактной культуры этого же вида, находившейся на стадии логарифмического роста.

Для оценки возможности восстановления численности микроводорослей после интоксикации, отфильтрованные клетки, росшие в присутствии токсикантов, промывали дистиллированной водой и помещали в чистую среду.

5. Исследуемые показатели

Численность клеток

Численность клеток (N), которая является одной из основных характеристик развития культуры и главным показателем токсического действия веществ, определяли с помощью камеры Горяева, под световым микроскопом ЛОМО Микмед-1 и рассчитывали по формуле:

$N = n \times 10^4$, где n – число клеток в 25 больших квадратах.

Численность клеток выражали в абсолютных значениях (количество клеток в 1 мл) и в относительных (в % по отношению к значению численности в контроле). Контролем всегда служили водоросли, растущие в чистой среде без добавления токсиканта.

Соотношение живых и мертвых клеток

Соотношение живых и мертвых клеток определяли с помощью метода люминесцентной микроскопии, основанном на способности некоторых соединений, входящих в состав живых организмов, светиться при облучении их ультрафиолетовыми и короткими сине-фиолетовыми лучами (Горюнова, 1952; Дмитриева, 1998). При этом свет люминесценции имеет большую длину волны, чем возбуждающий, что дает возможность после облучения наблюдать видимое свечение объекта. Учет живых и мертвых клеток проводили с помощью люминесцентного микроскопа Carl Zeiss Axioscop 2 FS Plus в выборке объемом не менее 100 клеток (живые клетки светились красным светом, мертвые – зеленым). Численность живых клеток выражали в % от общего числа просчитанных клеток (Дмитриева и др., 1986).

Расчет скорости роста численности

Показателем скорости роста численности клеток в популяции было количество клеточных делений в сутки (v , делений/сут), которое рассчитывали по формуле (Шлегель, 1987):

$$v = (\lg N_{(t+\Delta t)} - \lg N_t) / (\Delta t \times \lg 2), \text{ где:}$$

N_t – численность клеток в культуре в момент времени t ,

$N_{(t+\Delta t)}$ – численность клеток в культуре в момент времени $(t+\Delta t)$,

Δt – период изменения численности.

Размеры клеток

Линейные размеры клеток (Рисунок 3) «молодой» (4-6 суток) и «стареющей» (45-50 суток) культуры *M. arcuatum* определяли с помощью винтового окулярного микрометра АМ-9-2. В каждой пробе измеряли по 100 клеток. Клетки группировали в размерные классы с интервалом 0.5 и 2 мкм.

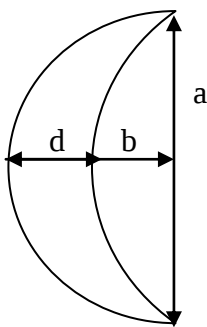


Рисунок 3. Клетка *Monoraphidium arcuatum*

d - максимальная ширина клетки

a - расстояние между концами клетки

b - длина перпендикуляра, опущенного от касательной к выпуклой стороне к точке посередине между концами клетки

Линейную длину клетки (*H*) рассчитывали с использованием элементов аналитической геометрии по формуле:

$$H = 2 \times \sqrt{a^2 + b^2}$$

Объем (*V*) и площадь поверхности (*A*) клеток *M. arcuatum* рассчитывали по формулам (Hillebrand et al., 1999):

$$V = \frac{d^2}{8} \times (2b - d + a) \times \left(\frac{\pi^2}{6} + 1 \right)$$

$$A = \frac{\pi^2 \times d}{2} \times \sqrt{\frac{\left(\frac{a}{2}\right)^2 + \left(b - \frac{d}{2}\right)^2}{2}}$$

Площадь поверхности (*A*) *S. quadricauda*, объем клеток (*V*) и их соотношение (удельную поверхность) рассчитывали на основании значений длины и ширины, представленных в работе Т. В. Бойчук (Бойчук, 2007) по формулам (Hillebrand et al., 1999):

$$V = \frac{\pi}{6} \times d^2 \times h$$

$$A = \frac{\pi \times d}{2} \times \left(d + \frac{h^2}{\sqrt{h^2 - d^2}} \times \arcsin \frac{\sqrt{h^2 - d^2}}{h} \right), \text{ где } \mathbf{d} - \text{ширина, } \mathbf{h} - \text{длина клетки}$$

Метод микрокультур

Изменения в структурном составе популяций исходных культур (макрокультур) оценивали с помощью метода микрокультур (Филенко и др., 2004). Для этого из исходных макрокультур на разные сутки роста случайным образом отбирали единичные микроводоросли, которые помещали в камеры Горяева так, чтобы в каждой из камер над счетной сеткой находилось 8–16 клеток *M. arcuatum* или 2–4 ценобия (8–16 клеток) *S. quadricauda*, а суммарное число клеток каждого вида во всех камерах составляло 80. Клетки в камерах выращивали в отфильтрованной из макрокультуре среде. Во избежание высыхания камеры помещали в чашки Петри на влажный бумажный фильтр. Наблюдения за развитием каждой отдельной клетки или ценобия в камерах проводили в течение трех суток с ежедневным учетом состояния клеток и их численности. Миниатюрные культуры, сформировавшиеся в камерах, называли микрокультурами. Структуру популяции в микрокультурах оценивали по изменению соотношения делящихся (давших потомство), условно покоящихся (не давших потомство в процессе наблюдения) и мертвых клеток. Жизнеспособность клеток в микрокультурах определяли по показаниям люминесцентной микроскопии на третьи сутки наблюдения.

По данным Марушкиной Е. В. (Марушкина, 2005), развитие процессов в микрокультурах адекватно отражает изменения в макрокультуре (коэффициент корреляции значений удельного прироста в макро- и микрокультуре составляет 0.96).

Оценка конкурентного эффекта

Конкурентный эффект *S. quadricauda* (S) на развитие *M. arcuatum* (M) в смешанной культуре рассчитывали по формуле (Ильяш, 1998):

$CE_{SM} = 1 - N_{MS} / N_{MM}$, где:

N_{MS} - численность *M. arcuatum* в смешанной культуре на 32 сутки,

N_{MM} - численность *M. arcuatum* в монокультуре на 32 сутки;

Конкурентный эффект *M. arcuatum* на развитие *S. quadricauda*:

$CE_{MS}=1-N_{SM}/N_{SS}$, где:

N_{SM} - численность *S. quadricauda* в смешанной культуре на 30 сутки,

N_{SS} - численность *S. quadricauda* в монокультуре на 30 сутки.

Микрофотографии клеток были сделаны на микроскопе Axioscop 2 FS plus (Carl Zeiss, Германия) с объективами $\times 40$, $\times 90$ и камер AxioCam MRC и AxioCam 200. Изображения поверхности клеток *M. arcuatum* и *S. quadricauda* (Рисунок 1) и частиц серебра (Рисунок 2) получены при помощи сканирующего электронного микроскопа Cam Scan S2 и трансмиссионного электронного микроскопа в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ.

Удельную поверхность с суспензией клеток водорослей в колбах и флаконах рассчитывали как отношение рабочей площади поверхности емкости (до уровня суспензии водорослей) к ее объему (S/V , $\text{мм}^2/\text{мл}$):

$(S/V)_k = (\pi r^2 + \pi(R+r)H)/50$ для колб,

$(S/V)_f = (\pi R^2 + 2\pi RH)/10$ для флаконов, где:

S – площадь поверхности емкости (мм^2),

V – объем культуры водорослей (мл),

r – радиус верхней границы культуральной жидкости в колбах,

R – радиус дна емкости,

H – высота столба культуральной жидкости.

В работу вошли результаты 95 хронических экспериментов (24 серии), в рамках которых проведено более 4000 измерений по определению общей численности клеток, соотношению живых и мертвых клеток, размеров клеток в макрокультуре и определению доли размножившихся, покоящихся и отмерших клеток в микрокультурах. Наиболее показательные результаты представлены в Приложении А.

Статистическую обработку полученных данных производили в соответствии с «Методическим руководством по биотестированию воды» (РД 118-02-90) в программе *Microsoft Excel 2010* с использованием пакета анализа данных.

Таблица 2. Структура работы

Стандартные условия	Интоксикация	
	Бихромат калия	Коллоидное серебро
<i>Измерение размеров клеток</i>		
<i>M. arcuatum</i>	-	-
<i>Влияние типа емкости (конические колбы и цилиндрические флаконы)</i>		
<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>	<i>M. arcuatum</i>	<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>
<i>Влияние степени синхронизации культуры</i>		
<u>Однократная и двукратная синхронизация</u> <i>M. arcuatum</i>		<u>Однократная синхронизация</u> <i>M. arcuatum</i>
<i>Определение структуры популяции по соотношению покоящихся, размножившихся и отмерших клеток (метод микрокультур)</i>		
<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>	<i>M. arcuatum</i>	<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>
<i>Восстановление популяции клеток после интоксикации</i>		
-	<i>M. arcuatum</i>	<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>
<i>Изменение свойств среды в процессе развития культуры</i>		
<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>	-	<i>M. arcuatum</i> , <i>S. quadricauda</i>
<i>Развитие смешанной двувидовой культуры</i>		
<i>M. arcuatum</i> + <i>S. quadricauda</i>	<i>M. arcuatum</i> + <i>S. quadricauda</i>	-

Примечание: «-» - измерения не проводили

ГЛАВА 3. Особенности развития культуры *Monoraphidium arcuatum* в норме

Первоначальной задачей работы было получение альгологически чистой культуры *M. arcuatum* и изучение особенностей ее развития в длительных экспериментах как характеристика культуры в качестве возможного объекта в биотестировании.

3.1. Получение альгологически чистой культуры *Monoraphidium arcuatum*

Для получения альгологически чистой культуры *M. arcuatum*, клетки микроводоросли выделяли из пробы фитопланктона, отобранной в летний период из р. Москва. На первом этапе была получена накопительная поликультура водорослей, которая, помимо *M. arcuatum*, состояла также из нескольких видов диатомовых и *Chlorella sp.* (Рисунок 4).

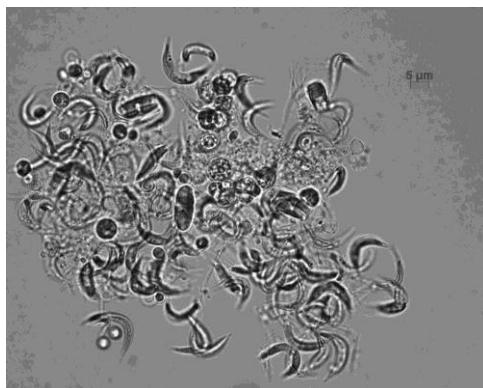


Рисунок 4. Накопительная поликультура водорослей из пресноводного фитопланктона р. Москвы (октябрь 2009 г.)

Из-за быстрого увеличения численности клеток *Chlorella sp.*, соизмеримого с темпом деления *M. arcuatum*, а также сходных размеров и плавучести, было невозможно подобрать оптимальные для *M. arcuatum* и одновременно неподходящие для *Chlorella sp.* условия культивирования. Поэтому, в связи с похожими биологическими характеристиками *Chlorella sp.* и *M. arcuatum*, процедуру очистки *M. arcuatum* проводили путем посева на твердую агаризованную среду.

Наиболее эффективным и надежным оказался стандартный микробиологический метод последовательного разбавления поликультуры питательной средой и последующего высева в чашки Петри с равномерным распределением шпателем по поверхности агара. Колонии в виде зеленых пятен диаметром около 1-3 мм начинали появляться примерно через 7-10 дней. При микроскопировании поверхности агара были отчетливо различимы как колонии из округлых клеток, так и колонии из клеток в форме молодого месяца. Через 14-20 суток колонии, состоявшие из клеток *M. arcuatum* и находившиеся на свободном от бактерий месте, переносили в жидкую питательную среду при помощи стерильной посевной иглы.

Было установлено, что внесение в чашки Петри 0.1 мл суспензии водорослей плотностью 800 кл/мл приводит к оптимальному расположению колоний, которые при этом развиваются из отдельных клеток. В этом случае процедура выделения клеток из отдельных колоний наименее кропотлива и вероятность задеть посевной иглой соседние колонии значительно уменьшается.

Культуру *M. arcuatum* удалось выделить также методом, в котором суспензию водорослей наносили на стерильный мембранный фильтр, находившийся на агаризованной питательной среде в центре чашки Петри. Ожидалось, что отдельные колонии появятся непосредственно на фильтре, но фильтр оказался равномерно зеленым, а колонии появлялись по краям чашки Петри непосредственно на питательной среде примерно через 10-14 дней. Выделять такие колонии также было удобно.

Поскольку иногда в культуральной среде развиваются грибы, и это может сильно сказываться на ростовых характеристиках микроводорослей, культуру проверяли на наличие грибной контаминации путем высева на богатую питательными веществами органическую среду LB. После 3 суток в термостате при температуре 40°C не было обнаружено грибных колоний. Бактериальная контаминация при работе с альгологически чистыми культурами зеленых водорослей не имеет существенного значения,

поскольку в большинстве случаев не оказывает негативного влияния на рост клеток водорослей. Поэтому агаризованную питательную среду готовили без добавления антибиотиков и фунгицидов.

В связи с вышесказанным, для выделения и очистки культуры *M. arcuatum* оптимальным оказался метод последовательного разведения и высева на агаризованную среду. Чтобы полученные монокультуры развивались из молодых клеток и обладали лучшими качествами, целесообразно разбавленную до плотности около 1500-2000 кл/мл культуру перелить в цилиндр и выдержать в течение 4-6 часов в темном месте. В результате старые клетки осядут на дно, тогда как молодые будут находиться в верхней части цилиндра и попадут в чашки Петри.

Для дальнейшей работы предпочтение отдавали наиболее жизнеспособным вариантам культуры, которые выбирали по большому количеству живых клеток на 5-8 сутки роста при исследовании люминесцентными методами. Идентификацию вида проводили при помощи «Краткого определителя хлорококковых водорослей Украинской ССР» (Царенко, 1990). Автор этого определителя - д.б.н, профессор Института ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Петр Михайлович Царенко, лично подтвердил на конференции в Киеве, посвященной актуальным проблемам современной альгологии, что водоросль определена правильно.

Микроводоросль *M. arcuatum* была окончательно введена в культуру и адаптирована к лабораторным условиям в марте 2010 года и в настоящее время находится на депонировании в коллекции культур микроводорослей института физиологии растений РАН (ИФР РАН - IPPAS).

3.2. Развитие культуры *Monoraphidium arcuatum* в стандартных условиях

Изучение роста культуры *M. arcuatum* проводили в стандартных условиях, рекомендованных большинством государственных методических пособий, в конических плоскодонных колбах Эрленмейера на 150 мл с 50 мл культуральной среды. Данные об изменении численности клеток в процессе

развития культуры *M. arcuatum* представлены на Рисунке 5 и в Приложении (Таблицы 2, 6, 7, 9 Приложения А).

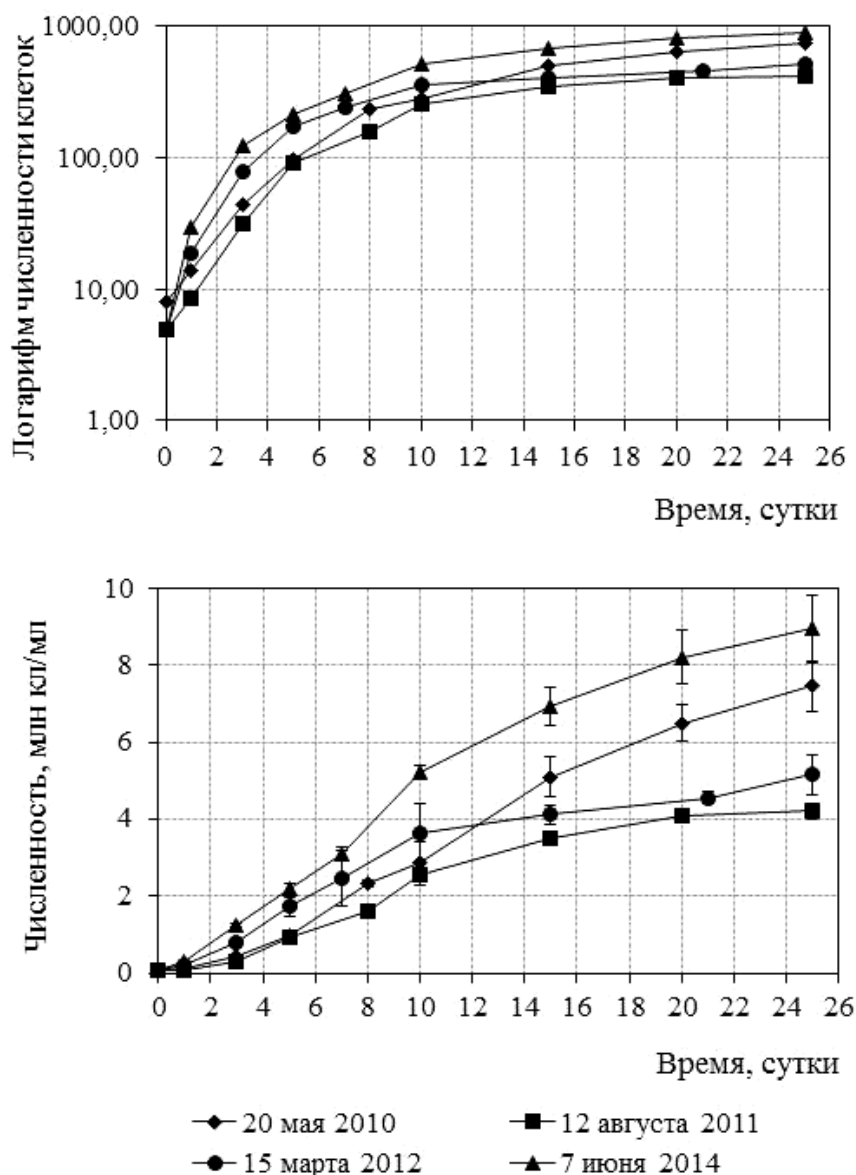


Рисунок 5. Численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при развитии в разные сезоны года

Как видно из Рисунка 5, характер роста культуры *M. arcuatum* во всех опытах, поставленных в разное время, соответствовал логистической кривой. Лаг-фаза отсутствовала или была очень короткой (до 1 суток), далее наступал период наиболее активного роста культуры - логарифмическая фаза, продолжавшаяся до 10 суток, после которых культура переходила к стационарной фазе роста.

В экспериментах, поставленных 20 мая 2010 года и 7 июня 2014 года,

переход к стационарной фазе был более плавным, поэтому к 25 суткам численность клеток в них превышала численность клеток в других экспериментах.

В эксперименте, поставленном в мае 2010 г., провели дополнительный подсчет численности на 53 сутки роста (6 июля), когда температура культуральной среды около двух недель держалась на уровне 28-29°C. Численность к этому моменту составила почти 12 млн. кл/мл (Таблица 2 Приложения А). Значительное увеличение численности клеток на поздних стадиях развития культуры *M. arcuatum* свидетельствует о достаточном для нее количестве питательных веществ в среде при длительном культивировании, либо о способности клеток получать биогенные элементы из альтернативных источников.

Наиболее интенсивный темп деления был у клеток в период логарифмической фазы роста: за сутки происходило в среднем 0.59 клеточных делений, что приводило к значительному увеличению общей численности к 10 суткам (Таблица 3). Максимальное количество клеточных делений в начале развития культуры было отмечено в экспериментах, поставленных в марте 2012 и в июне 2014 гг (0.62 и 0.67 кл. дел./сут.). В последующем темп деления клеток снижался, в период 20-25 суток происходило только 0.01-0.04 кл. дел. в сутки.

Таблица 3. Количество клеточных делений в сутки (v) в культуре *Monoraphidium arcuatum* в колбах

Время постановки эксперимента	Срок (в сутках)			
	0-10	10-15	15-20	20-25
20 мая 2010	0.52±0.03	0.17±0.08	0.07±0.05	0.04±0.05
12 августа 2011	0.57±0.02	0.09±0.02	0.04±0.01	0.01±0.02
15 марта 2012	0.62±0.03	0.04±0.04	0.03±0.03	0.04±0.03
7 июня 2014	0.67±0.01	0.08±0.03	0.05±0.04	0.03±0.05

В процессе развития культуры *M. arcuatum* отмечали высокое содержание живых клеток, и даже на поздних сроках развития (30 и более суток) количество мертвых клеток в ней не превышало 10 % (Таблицы 6а, 7а, 9а Приложения А).

Таким образом, развитие культуры *M. arcuatum* во всех экспериментах проходило в соответствии с логистической кривой и сопровождалось снижением темпа деления. Максимальная численность клеток к 25 суткам роста была отмечена в экспериментах, поставленных в мае и июне, что свидетельствует о зависимости развития культуры от сезона.

О развитии культуры *S. quadricauda* известно, что оно так же, как и развитие *M. arcuatum*, происходит в соответствии с логистической кривой (Бойчук, 2007; Марушкина, 2005). Логарифмическая фаза роста у *S. quadricauda* наступает после 2-5-суточной лаг-фазы, а переход к стационарной фазе - примерно на 25-28 сутки. Развитие же *M. arcuatum* в стандартных условиях начинается не позже, чем через сутки. Развитие обеих культур зависит от сезона. У *S. quadricauda* более высокие показатели численности и меньшая продолжительность одного клеточного деления наблюдаются летом, тогда как в весенний и осенне-зимний периоды, наоборот, численность и скорость роста снижаются (Бойчук, 2007).

3.3. Развитие культуры *Monoraphidium arcuatum* в емкостях разного типа

Условия культивирования оказывают большое влияние на характер развития культуры и физиологическое состояние клеток, что в результате может привести к изменению ее чувствительности. Изучение зависимости развития водорослей от параметров культивирования может послужить основой для совершенствования и оптимизации процедуры биотестирования. В некоторых методических руководствах токсикологические эксперименты предлагается проводить не в колбах, а в других емкостях, с различной формой и объемом. Например, в полевых условиях для удобства и относительной простоты выполнения рекомендовано применение

пенициллиновых пузырьков (Дмитриева и др., 1998). Кроме того, постановка экспериментов в емкостях меньшего объема позволяет следовать принципу экономии, не расходуя лишнее рабочее пространство, компоненты среды и тестируемые образцы. В связи с вышесказанным, было проведено сравнительное исследование роста культуры *M. arcuatum* в цилиндрических флаконах малого объема и в конических колбах.

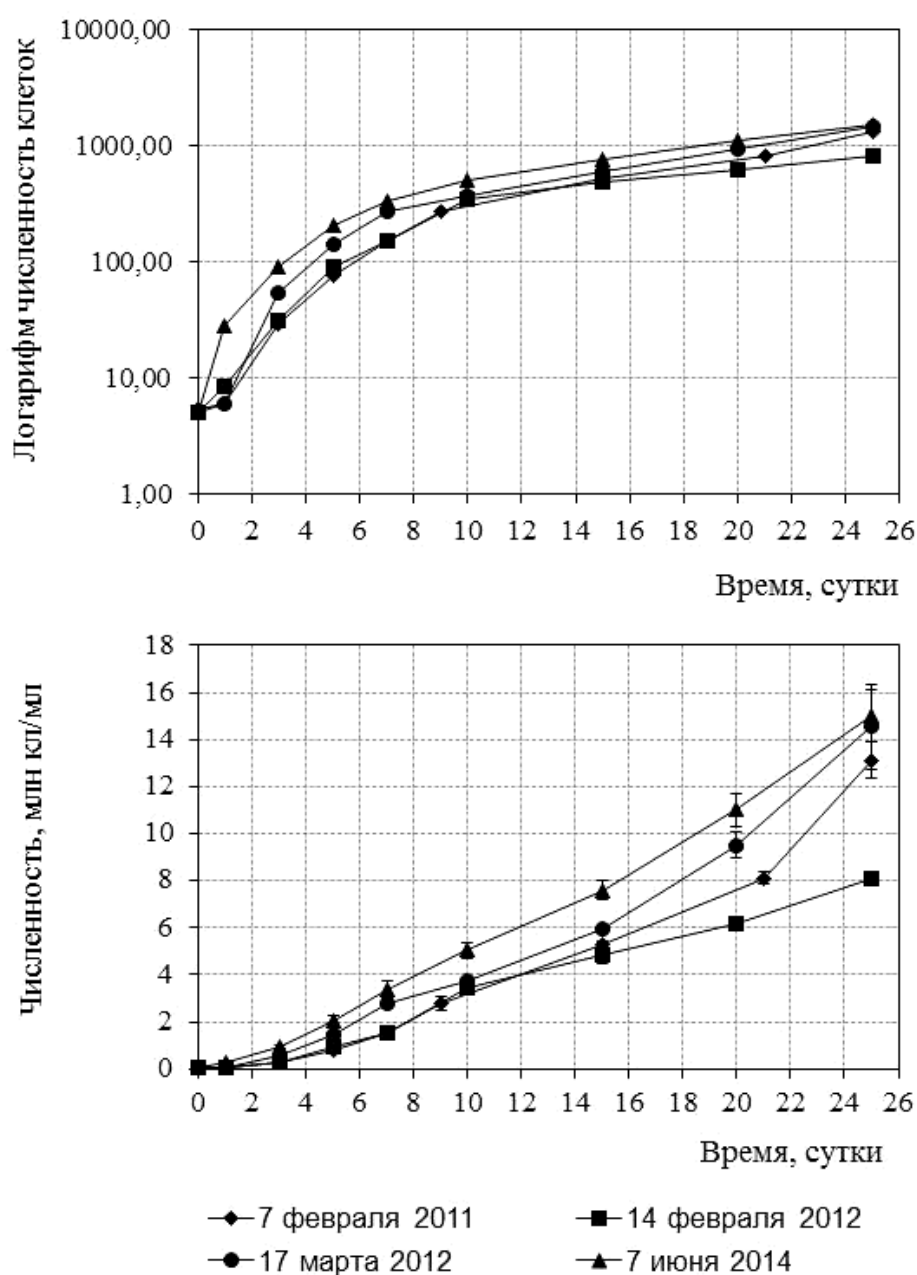


Рисунок 6. Изменение численности клеток *Monoraphidium arcuatum* во флаконах в разные сезоны года

При выращивании во флаконах (Таблицы 4, 8, 13 Приложения А) во всех вариантах увеличение численности клеток *M. arcuatum* происходило более равномерно, чем в колбах (Рисунок 6). Лаг-фаза была короткой (не более суток), логарифмическая фаза длилась также до 10 суток, после которых увеличение численность клеток в культуре продолжало увеличиваться достаточно активно. Стационарную фазу роста не наблюдали даже в длительных экспериментах, поставленных в зимний период и весной. Поставленные в феврале 2011 и марте 2012 г эксперименты характеризовались сходной тенденцией развития и близкими значениями численности на протяжении всего периода наблюдений. Однако в феврале 2012 г. культура *M. arcuatum* развивалась менее интенсивно, чем в феврале 2011 г., и поэтому численность клеток в ней на 25 сутки была в 1.5 раза ниже. Наиболее высокие значения численности клеток к 25 суткам были в феврале 2011, июне 2014 и марте 2012 гг.

Таблица 4. Количество клеточных делений в сутки (v) в культуре *Monoraphidium arcuatum* во флаконах

Время постановки эксперимента	Срок (в сутках)			
	0-10	10-15	15-20	20-25
7 февраля 2011	0.63±0.03	0.16±0.04	0.10±0.02	0.17±0.03
14 февраля 2012	0.61±0.02	0.10±0.03	0.07±0.03	0.08±0.02
17 марта 2012	0.62±0.01	0.14±0.02	0.13±0.02	0.12±0.05
7 июня 2014	0.67±0.02	0.12±0.03	0.11±0.04	0.09±0.04

Расчет скорости роста *M. arcuatum* во флаконах (Таблица 4) выявил наиболее интенсивный темп в период логарифмической фазы роста, где за сутки происходило 0.61–0.67 клеточных делений, что приводило к значительному увеличению общей численности к 10 суткам. В последующем темп деления клеток во флаконах снижался, но более плавно, чем в колбах. В период 20-25 суток во флаконах происходило в среднем 0.08-0.17 кл.

дел./сут, что превышало эти значения в колбах (Таблица 3), и поэтому численность клеток во флаконах была выше.

В результате проведенных нами исследований было обнаружено, что развитие *M. arcuatum* во флаконах характеризуется отсутствием стационарной фазы роста. Численность клеток *M. arcuatum* во флаконах в целом выше, чем в колбах, несмотря на одинаковую исходную плотность. Зависимость интенсивности роста численности *M. arcuatum* от сезона, выявленная при росте в колбах, была менее выражена во флаконах.

Поскольку на развитие водорослей в лабораторных условиях могут влиять неконтролируемые факторы (погодные условия, электромагнитная обстановка, солнечная активность и др.), мы исследовали развитие *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в колбах и во флаконах одновременно в марте 2012 года (Рисунок 7).

Численность клеток *M. arcuatum* в разных емкостях изменялась одинаково вплоть до 10 суток, после которых стала интенсивно возрастать во флаконах и на 30-е сутки эксперимента была уже вдвое выше, чем в колбах (Рисунок 7). При развитии культуры *S. quadricauda* в разных типах емкостей принципиальных различий в численности клеток до 10 суток не было отмечено также, как и у *M. arcuatum*. После 10 суток и до конца наблюдения численность клеток *S. quadricauda* во флаконах лишь немного превышала численность в колбах (на 30 % к 30 суткам). Интересно отметить, что численность клеток *S. quadricauda* во флаконах и численность клеток *M. arcuatum* в колбах изменялась в близких пределах.

Скорость деления клеток *M. arcuatum* в разных емкостях была одинаковой в период логарифмической фазы роста и составляла 0.62 дел/сут (Таблица 5). По мере развития культуры, скорость роста численности клеток снижалась, снижение было более плавным во флаконах, где процессы деления в целом проходили интенсивнее, чем в колбах.

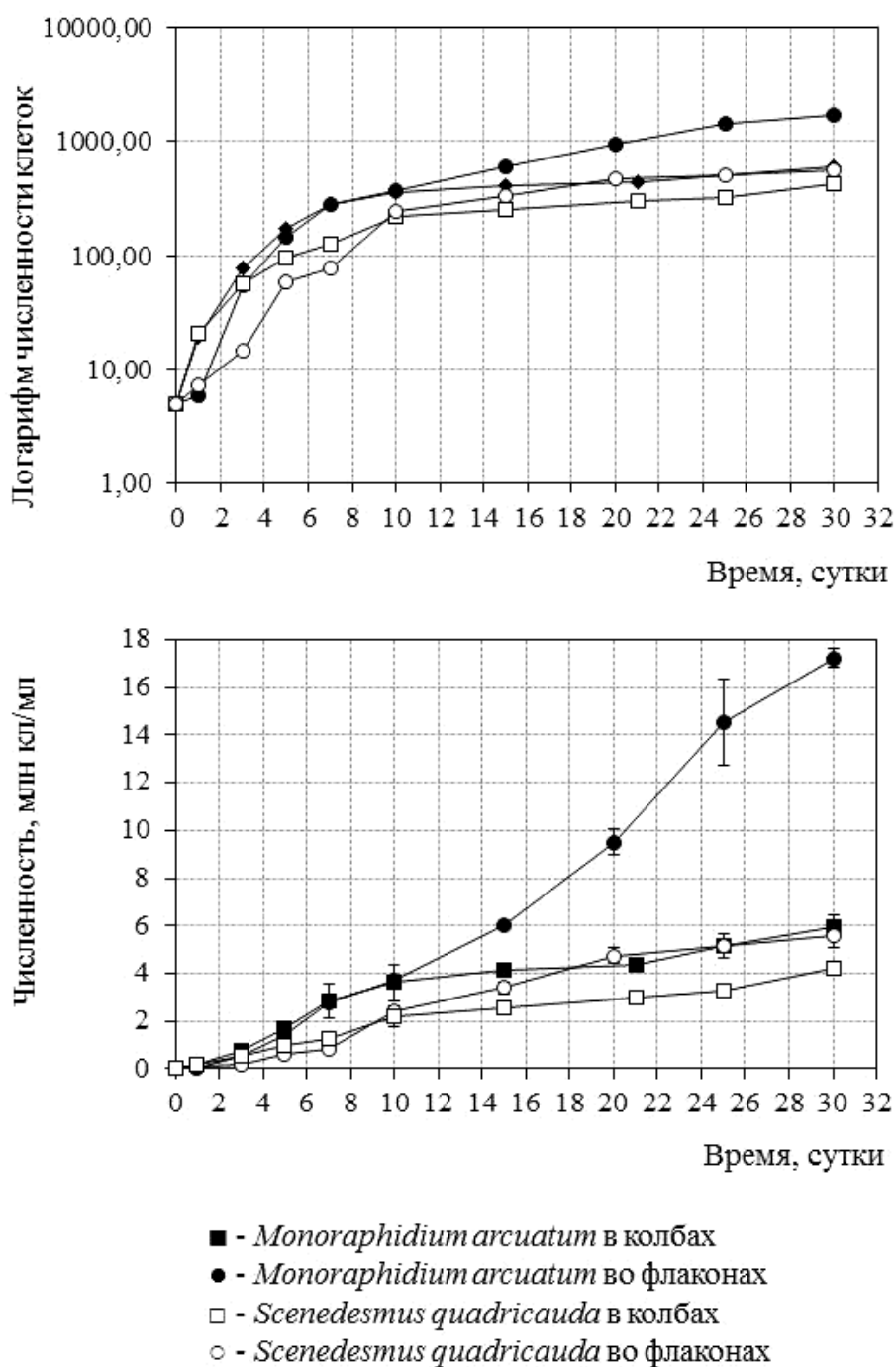


Рисунок 7. Численность клеток в культурах *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при выращивании во флаконах и в колбах (март-апрель 2012 г.)

Максимальная скорость роста численности *S. quadricauda* была также отмечена в период логарифмической фазы роста при культивировании в обоих типах емкостей и составила 0.54-0.56 дел/сут. Далее она снижалась, причем снижение скорости роста численности было более быстрым в колбах,

где происходило в 1.5-2 раза меньше клеточных делений, чем во флаконах, но после 15 суток эксперимента темп роста численности в разных емкостях сравнился (Таблица 5).

Таблица 5. Количество клеточных делений в сутки (v) в культурах *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при выращивании в разных емкостях (март-апрель 2012 г)

Культура	Емкость	Срок (в сутках)				
		0 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	Колбы	0.62±0.06	0.04±0.02	0.02±0.01	0.06±0.04	0.12±0.04
	Флаконы	0.62±0.05	0.14±0.02	0.13±0.03	0.12±0.05	0.04±0.02
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Колбы	0.54±0.04	0.06±0.04	0.04±0.03	0.03±0.02	0.07±0.02
	Флаконы	0.56±0.03	0.10± 0.05	0.09± 0.04	0.02± 0.01	0.03± 0.02

Таким образом, самый высокий темп деления у обеих культур наблюдался в начальный период роста (до 10 суток) как в колбах, так и во флаконах. После 10 суток темп деления клеток замедлялся, при этом во флаконах количество клеточных делений в сутки снижалось менее резко, чем в колбах.

Итак, численность клеток *M. arcuatum* стабильно превышала численность *S. quadricauda* уже после 3 суток роста при близких значениях числа клеточных делений. При этом численность клеток обеих культур во флаконах была выше, чем в колбах, но у культуры *M. arcuatum* эта разница была намного более выражена, чем у *S. quadricauda*. Таким образом, выращивание *M. arcuatum* во флаконах позволяет дольше, чем в колбах, поддерживать культуру в активном состоянии и получать большую (до 2 раз)

численность клеток.

Более активный рост *M. arcuatum* во флаконах, и, как следствие, преобладание численности по сравнению с колбами, можно объяснить разной удельной поверхностью этих емкостей. Величина удельной поверхности определяет эффективность использования света клетками водорослей в суспензии. Наши расчеты показали, что у цилиндрических флаконов значение удельной поверхности в 2.2 раза выше, чем у конических колб. При более высоком отношении площади поверхности сосуда к его объему обеспечивается лучшее освещение столба жидкости с клетками водорослей.

В 7-суточном эксперименте была предпринята попытка оценить влияние боковой подсветки на рост водорослей в разных емкостях. Боковую поверхность емкостей закрывали фольгой так, чтобы столб жидкости с водорослями оказался в затенении. На Рисунке 8 представлены кривые изменения численности в экранированных фольгой емкостях относительно контроля (100%). Контролем в каждом случае служил рост культуры в соответствующих незатененных емкостях. Ингибирование роста в экранированных флаконах было более значительным, чем в колбах.

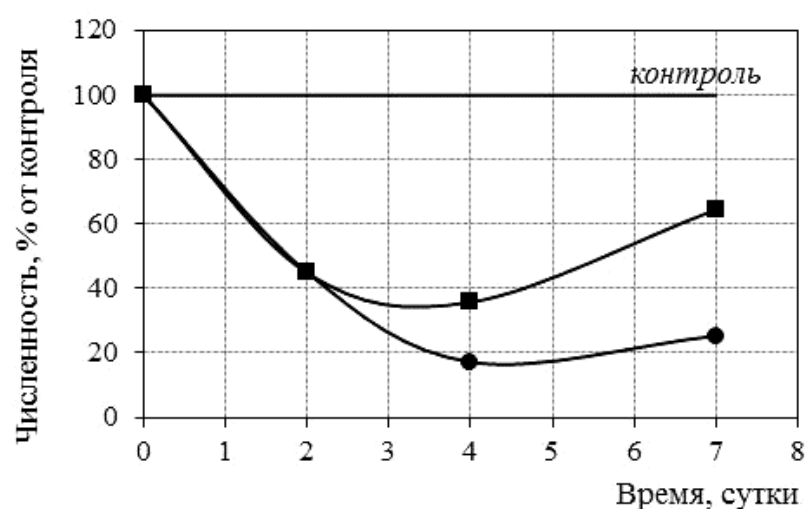


Рисунок 8. Относительная численность клеток *Monoraphidium arcuatum* в колбах (■) и флаконах (●) с экранированным боковым освещением

Таким образом, клетки *M. arcuatum* во флаконах, как правило, продолжают более интенсивно делиться и на поздних стадиях, что не происходит при росте в колбах. Эти особенности могут быть обусловлены различием в геометрии самих емкостей (цилиндр и конус). По-видимому, при росте в цилиндрических флаконах большое значение имеет боковое освещение, благодаря которому свет легко проходит к клеткам, находящимся в толще культуральной жидкости. В результате доступность света для каждой конкретной клетки во флаконе увеличивается, тогда как в колбах клетки в большей степени экранируются клетками с периферии.

3.4. Влияние степени синхронизации на развитие культуры *Monoraphidium arcuatum*

Синхронизация является способом увеличения однородности культуры микроводорослей. Чем более синхронизирована культура, тем менее она гетерогенна и тем больше клеток в ней находятся на одной и той же стадии жизненного цикла. Степень синхронизации оказывает влияние на скорость роста и увеличение численности клеток, чувствительность/устойчивость к различным воздействиям.

В наших экспериментах исследовали развитие однократно- и дважды синхронизированной культуры *M. arcuatum* в колбах в ноябре 2013 года (Таблицы 18, 19 Приложения А). На Рисунке 9 для сравнения представлено также изменение численности во флаконах в летний период в качестве примера наиболее интенсивного развития культуры *M. arcuatum*, как было показано ранее (см. 3.3).

Развитие однократно синхронизированной культуры *M. arcuatum* в колбах характеризовалось короткой фазой логарифмического роста и ранним (после 7 суток) наступлением стационарной фазы, в связи с чем численность клеток была низкой (Рисунок 9). Дважды синхронизированная культура *M. arcuatum* росла более интенсивно, в результате к 15 суткам численность клеток в ней была почти в 3 раза выше численности клеток в однократно

синхронизированной культуре, но при этом сопоставима с численностью клеток во флаконах в июне 2014 г.

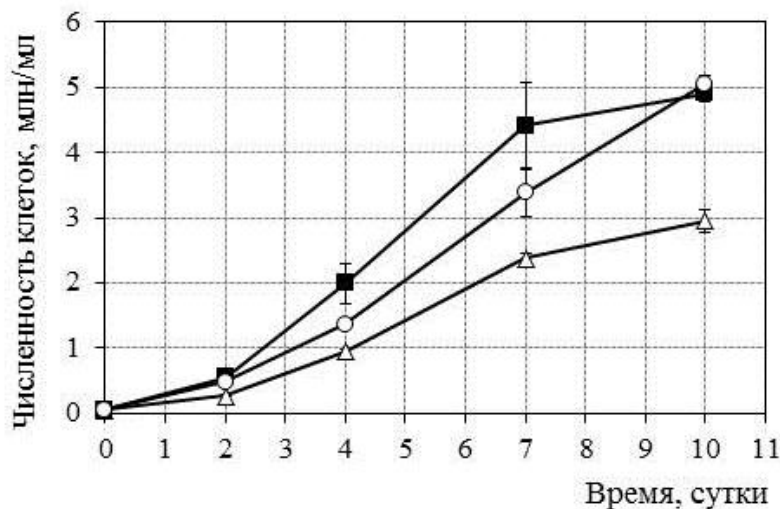


Рисунок 9. Численность клеток однократно- и дважды синхронизированной культуры *Monoraphidium arcuatum*

Проведенное исследование позволило установить влияние степени синхронизации на характер роста культуры *M. arcuatum*. При повторной синхронизации численность клеток была значительно выше, чем в однократно синхронизированной культуре, и достигала максимальных значений, отмеченных для этой культуры в оптимальных условиях роста в летний период.

Исследования лабораторной культуры *S. quadricauda* (Бойчук, 2007) не выявили существенных различий ее роста при повторной синхронизации культуры. Существенное влияние оказывала фаза роста, на которой культура была взята в эксперимент.

3.5. Морфологическая характеристика и размерная гетерогенность клеток в культуре *Monoraphidium arcuatum*

Морфологию и размеры клеток *M. arcuatum* определяли в «молодой» (4-6 суток) и «стареющей» (45-50 суток) культуре, то есть в процессе развития культуры (Рисунок 10; Таблица 1 Приложения А).

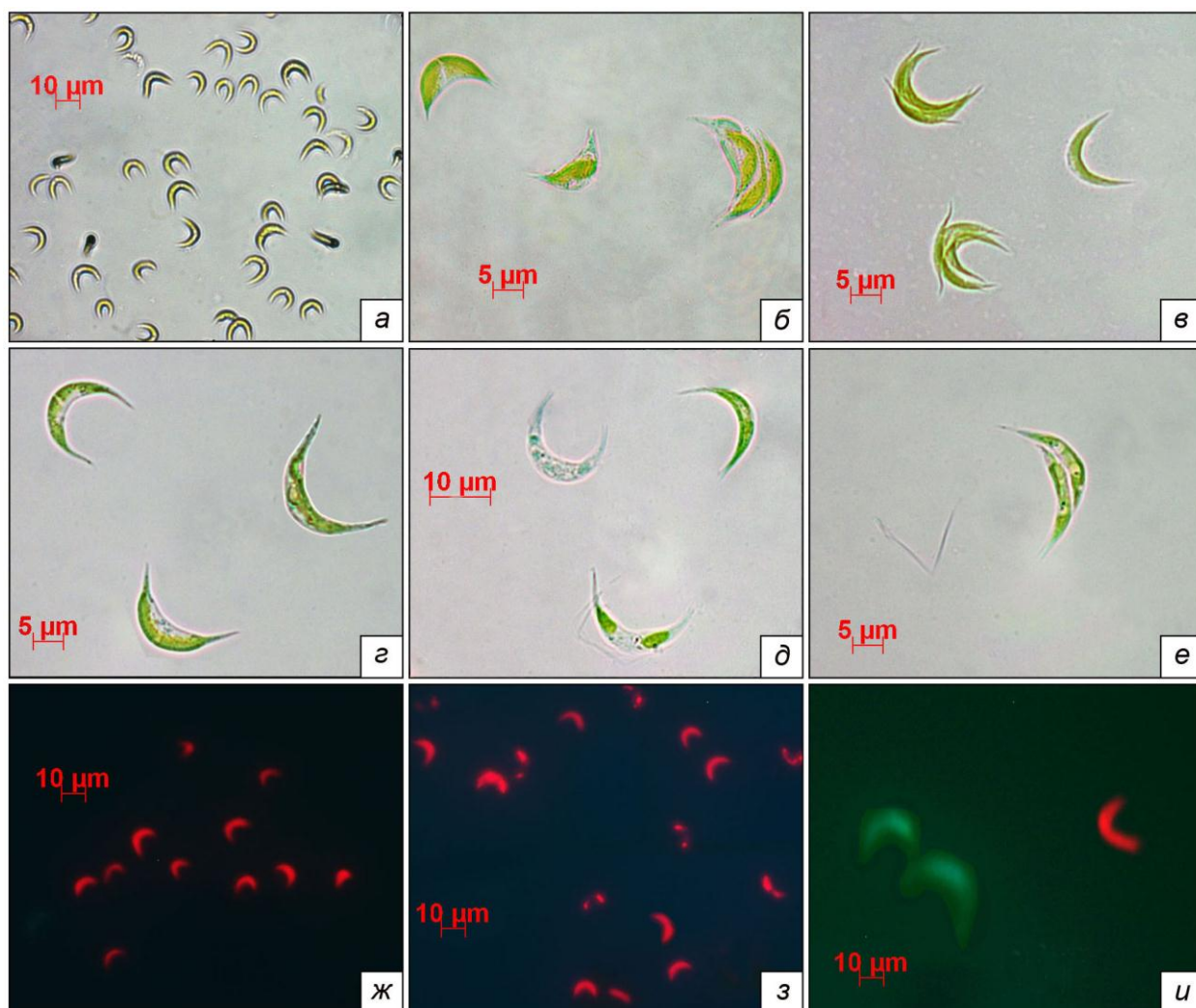


Рисунок 10. Клетки *Monoraphidium arcuatum* в «молодой» 4-6-суточной культуре (а, б, в), «стареющей» 6-7-недельной культуре (г, д, е) и их свечение при облучении УФ в люминесцентном микроскопе (ж, з, и)

а – клетки в «молодой» культуре;

б – утолщенные клетки, формирующие автоспоры, и выход дочерних клеток из материнской;

в – дочерние клетки, образовавшиеся из одной материнской клетки;

г – мертвая клетка и клетка с фрагментированным хроматофором;

д – вакуолизированная клетка;

е – клетки, образовавшиеся после деления, и оболочка от материнской клетки;

ж - равномерное свечение клеток в «молодой» культуре;

з – свечение отмирающих клеток с фрагментированным хроматофором;

и – живые (красный цвет) и мертвые (зеленый цвет) клетки

Клетки *M. arcuatum* дуговидно или подкововидно изогнутые с заостренными концами, одиночные, не образуют колоний и не агглютинируют. В молодой культуре в условиях оптимального роста преобладают клетки с правильными формами, в которых хроматофор расположен равномерно и вакуоли практически отсутствуют (Рисунок 10: а, б, в, ж). По мере развития культуры, а также при ухудшении условий культивирования (например, при затенении), наблюдается фрагментация хроматофора (рис 10: г, д, з) и появление большого количества вакуолей (Рисунок 10: д), что может приводить к изменению формы клеток.

В люминесцентном микроскопе при облучении ультрафиолетом (Рисунок 10, ж-и), клетки *M. arcuatum* светятся по-разному в зависимости от состояния хроматофора. Молодые активно фотосинтезирующие клетки обладают равномерным красным свечением (Рисунок 10, ж), в отличие от более зрелых, у которых, как правило, светятся в основном только участки на концах (Рисунок 10, з). Для недавно отмерших клеток характерно зеленое свечение (Рисунок 10, и).

Размеры клеток (ширина и осевая длина) изменяются в пределах 1.8–4.6×14.2–28.9 мкм, расстояние между концами клетки составляет 3.4–16.5 мкм. Анализ распределения клеток *M. arcuatum* по ширине и длине выявил большую размерную гетерогенность в «стареющей» культуре по сравнению с «молодой» (Рисунок 11).

В «молодой» культуре *M. arcuatum* ширина клеток изменялась от 2.6 до 4.5 мкм и в среднем составляла 3.4 ± 0.2 мкм, в то время как в «стареющей» культуре при близких средних значениях (3.2 ± 0.2 мкм) этот показатель изменялся в более широком интервале – от 1.8 до 4.8 мкм (Рисунок 11А). Однако как в «стареющей», так и в «молодой» культуре преобладали клетки шириной 2.5 - 3 мкм (44 % и 54 %), вторыми по численности были клетки шириной 4 - 4.5 мкм (20 % и 24 %).

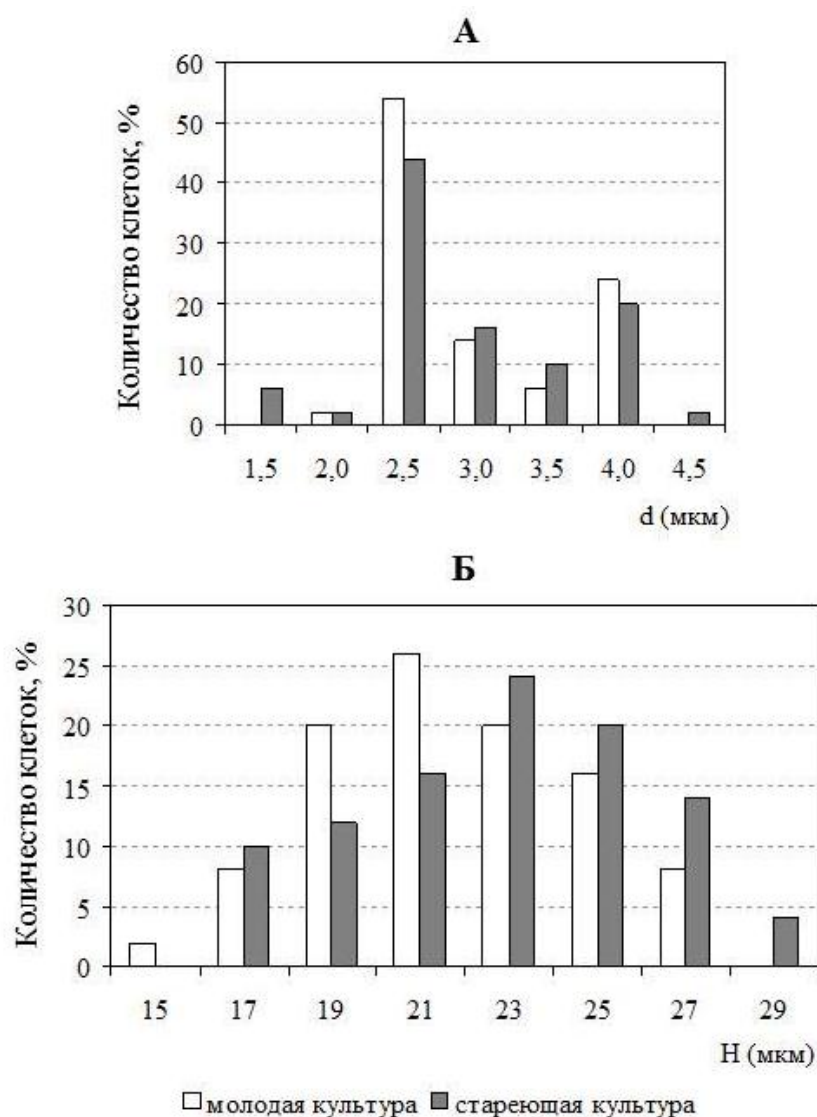


Рисунок 11. Распределение клеток по ширине (А) и длине (Б) в «молодой» и «стареющей» культуре *Monoraphidium arcuatum*

В «молодой» культуре длина большинства клеток (66 %) изменялась в интервале от 18 до 24 мкм, при этом отсутствовали клетки, у которых бы этот параметр превышал 28 мкм (Рисунок 11Б). В «стареющей» культуре большинство клеток (60 %) имели длину от 20 до 26 мкм, при этом встречались более длинные клетки (28-30 мкм), но отсутствовали короткие (14-16 мкм). Средняя длина клетки в «стареющей» культуре была больше, чем в «молодой» (22.7 ± 0.9 мкм против 21.7 ± 0.8 мкм).

На основании измеренных линейных параметров клеток *M. arcuatum* были рассчитаны площадь поверхности и объем клеток *M. arcuatum*. Также

рассчитывали показатель удельной поверхности клеток (отношение площади поверхности клетки к ее объему), который учитывает одновременно изменения и площади, и объема. В некоторых исследованиях прослеживается связь величины удельной поверхности с функциональным состоянием клеток водорослей (Никонова, 1996; Хайлов, 1991). Этот показатель, кроме того, отражает абсорбционный потенциал клетки, т.е. косвенно характеризует ее поглощающую способность.

В «молодой» культуре площадь поверхности и объем клеток характеризовались немного меньшим диапазоном значений, чем в «стареющей» культуре при близких средних величинах (Таблица 1 Приложения А). Средние значения площади клеток в «стареющей» и в «молодой» культуре (114.7 ± 10.4 мкм² и 112.9 ± 9.8 мкм², соответственно) практически не отличались, так же как и значения объема клеток в этих культурах (105.8 ± 15.8 мкм³ и 103.7 ± 16.0 мкм³, соответственно). Средние значения удельной поверхности клеток *M. arcuatum* также не зависели от возраста культуры (1.2 ± 0.1 в молодой и 1.3 ± 0.1 мкм⁻¹ в старой культуре).

Таким образом, в культуре *M. arcuatum* выделялось 2 пика клеток по ширине: наименее широкими были молодые клетки, увеличение ширины происходило у клеток, формирующих автоспоры. В «молодой» культуре оба пика были более выражены, чем в «стареющей», где в результате снижения интенсивности деления присутствовали промежуточные формы клеток. Крайние значения ширины клеток в «стареющей» культуре могут быть характерны для отмирающих и недоразвитых (в силу истощения среды) клеток (1.5-1 мкм) и клеток, не участвующих в размножении, но увеличивающихся в размере (4.5-5 мкм). По мере развития культуры в ней отмечалась тенденция к удлинению клеток. Увеличение длины клеток в «стареющей» культуре может быть следствием возрастания количества клеток, не участвующих в делении. Вероятнее всего, длина зависит от возраста клетки.

В «стареющей» культуре возрастала также гетерогенность по объему и

площади поверхности клеток. Значение средней площади поверхности, объема и удельной поверхности клеток не зависели от возраста культуры.

Прохоцкой В. Ю. (Прохоцкая, 2000) для культуры *S. quadricauda* было показано присутствие «мелких» (молодых) и «крупных» (зрелых, готовых к делению) клеток, которые различались в основном по ширине. У «мелких» клеток, которые входили преимущественно в состав 4-клеточных ценобиев, ширина была около 3 мкм, тогда как у «крупных», обычно составлявших 2-клеточные ценобии, она варьировала в пределах 4 - 4.5 мкм. В процессе роста культуры их соотношение изменялось: в более молодой культуре преобладали крупные клетки (70 %), а в дальнейшем их доля снижалась до 30 %. При этом длина клеток была достаточно постоянной и составляла 9.5 – 10.5 мкм. Другие исследователи, изучавшие эту культуру, отмечают сходные размеры клеток *S. quadricauda*. По данным Ч. Ицзюнь (Ицзюнь, 1994) ширина клеток изменялась в пределах 3.18–4.14 мкм, а длина - 9.15–12.8 мкм; по данным Т.В. Бойчук (Бойчук, 2007) средняя ширина клеток составляла 3.9–4.5 мкм, а средняя длина - 9.4–9.6 мкм. Средние значения площади поверхности и объема клетки *S. quadricauda* составили $110.1 \pm 10.5 \text{ мкм}^2$ и $93.0 \pm 14.4 \text{ мкм}^3$, соответственно.

Таким образом, клетки *M. arcuatum* и *S. quadricauda* сопоставимы по размерам и обладают в среднем близкими значениями площади поверхности, несмотря на сильные различия формы. Отношение площади поверхности к объему у *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в среднем было близким и составляло $1.2 \pm 0.1 \text{ мкм}^{-1}$.

3.6. Структура популяции *Monoraphidium arcuatum*

О структуре популяции *M. arcuatum* в процессе развития культуры судили по соотношению делящихся, покоящихся и отмерших клеток, которое определяли методом микрокультур. Для этого из растущей культуры (макрокультуры), на 1, 8, 15, 17 и 36 сутки отбирали единичные клетки и формировали микрокультуры. За микрокультурами наблюдали в течение 3

суток, учитывая количество делящихся (давших потомство), покоящихся (не разделившихся в процессе наблюдения) и мертвых клеток (изначально мертвых или отмерших в процессе наблюдения).

В структурном составе популяций *M. arcuatum* макрокультур разного возраста преобладала фракция покоящихся клеток (до 72 % к 36 суткам) (Рисунок 12). Максимальное количество делящихся клеток *M. arcuatum* (41 %) было отмечено в период 8-11 суток, когда макрокультура находилась в фазе логарифмического роста, но по мере приближения стационарной фазы (17-20 сутки), число делящихся клеток в микрокультуре снизилось до 28 %. Доля мертвых клеток *M. arcuatum* не превышала 7 %.

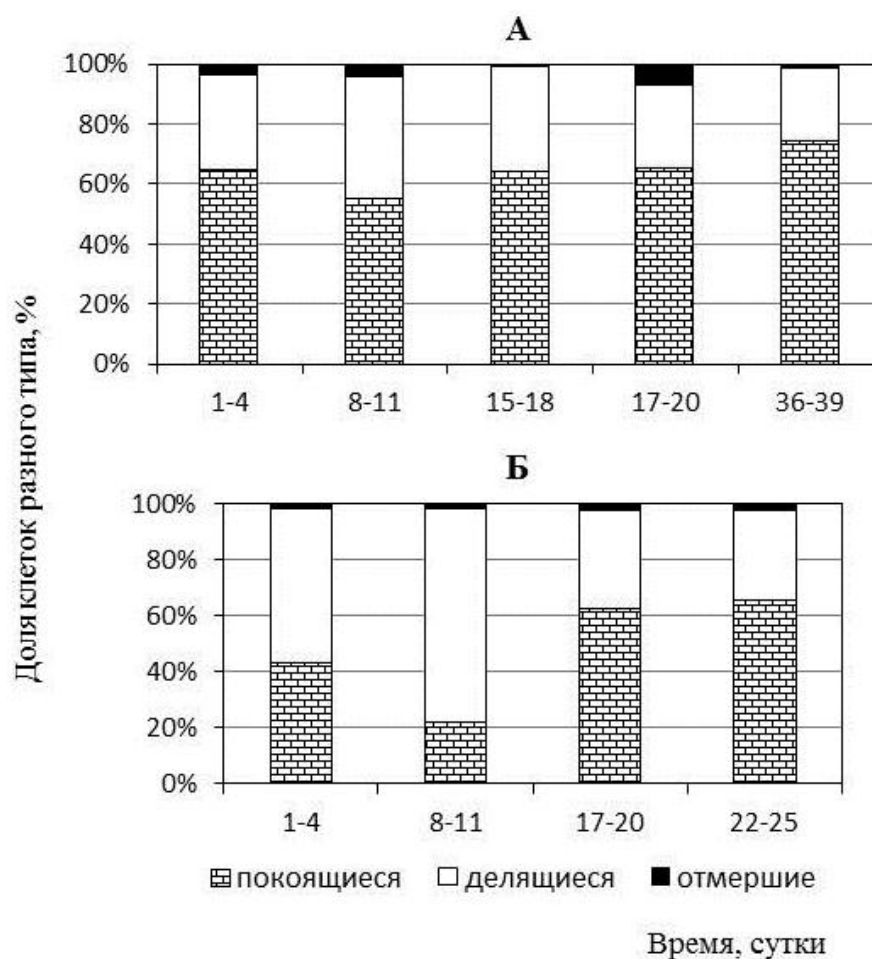


Рисунок 12. Структурный состав макрокультур *Monoraphidium arcuatum* (А) и *Scenedesmus quadricauda* (Б) (в %) в процессе их развития, определенный с помощью метода микрокультур

Популяция *S. quadricauda* в начальный период (1–4 сутки) на 55 % состояла из делящихся клеток, количество которых к 8 суткам возрастало до 80 %, при этом скорость деления клеток увеличивалась почти вдвое (Рисунок 12). По мере развития макрокультуры *S. quadricauda* доля делящихся клеток снижалась (до 32 % к 22 суткам) за счет их перехода в состояние покоя. Содержание мертвых клеток колебалось в пределах 2 – 3 % на протяжении всего периода наблюдений. Эти результаты не противоречат данным О. Ф. Филенко с соавторами (Филенко и др., 2007а), подробно изучившими изменение фракционного состава модельной популяции *S. quadricauda*.

Итак, структура популяций обеих культур изменялась сходным образом – к 8 суткам количество делящихся клеток возрастало, а к 17 уже заметно снижалось, и в популяции начинали преобладать покоящиеся клетки. Наблюдаемое увеличение количества делящихся клеток приводило к увеличению общей численности клеток в макрокультуре. Следует подчеркнуть, что, хотя доля делящихся клеток в микрокультуре *M. arcuatum* даже в период самого активного роста не превышала 40 % (против 80 % у *S. quadricauda*), численность клеток в макрокультуре этого вида всегда была выше, чем у *S. quadricauda*. Это связано с образованием клетками *M. arcuatum* большего количества автоспор (4-8 против 2-4 у *S. quadricauda*). В процессе наблюдения за микрокультурами большинство клеток *M. arcuatum* (53-84 %) образовывали по 4 автоспоры и только в период 17–20 суток преобладали клетки, дававшие по 8 автоспор (68 %). На основании этих наблюдений можно предположить, что клетки *M. arcuatum* образуют при делении 4 автоспоры в «нормальном» состоянии культуры, а образование 8 автоспор, по-видимому, является компенсаторным механизмом в условиях снижения числа делящихся клеток при старении культуры, а также может иметь место при наступлении неблагоприятных условий (изменение температуры, освещенности, воздействие токсикантов или экзометаболитов и др.).

Согласно опубликованным данным (Марушкина, 2005; Дмитриева и

др., 2014), тенденция изменения структуры популяции *S. quadricauda* при развитии в чистой среде согласуются с полученными нами данными.

3.7. Изменение качества культуральной среды по мере развития *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda*

Для решения поставленной задачи исследовали рост *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в фильтрах 7-, 10-, 21-суточной культуры *M. arcuatum* и 2-, 7-, 21-, 30- суточной культуры *S. quadricauda* (Таблицы 12, 16 Приложения А). Фильтраты, полученные в разные сроки развития исходных культур, были условно названы 2-, 5-, 7-, 10-, 21- и 30-суточными. Интактные клетки каждого из видов, выращенные в отдельной культуре, которая в момент пересева находилась на логарифмической фазе роста, инокулировали в фильтраты и одновременно в чистую среду как контроль (Рисунки 13, 14).

В 7-суточном фильтрате численность клеток *M. arcuatum* изменялась в пределах контроля вплоть до 20 суток, а после начинала снижаться и к 30 суткам была уже достоверно ниже (Рисунок 13Б). Действие 10-суточного фильтрата было другим: он ингибировал рост водорослей уже на начальных этапах, в результате чего к 6 суткам численность клеток была на 50% ниже, чем в контроле, и культура переходила к стационарной фазе роста (Рисунок 13А). То же самое наблюдалось и при выращивании культуры *M. arcuatum* в 21-суточном фильтрате, который оказывал еще более ингибирующее действие, так что стационарная фаза наступала уже после 3 суток эксперимента.

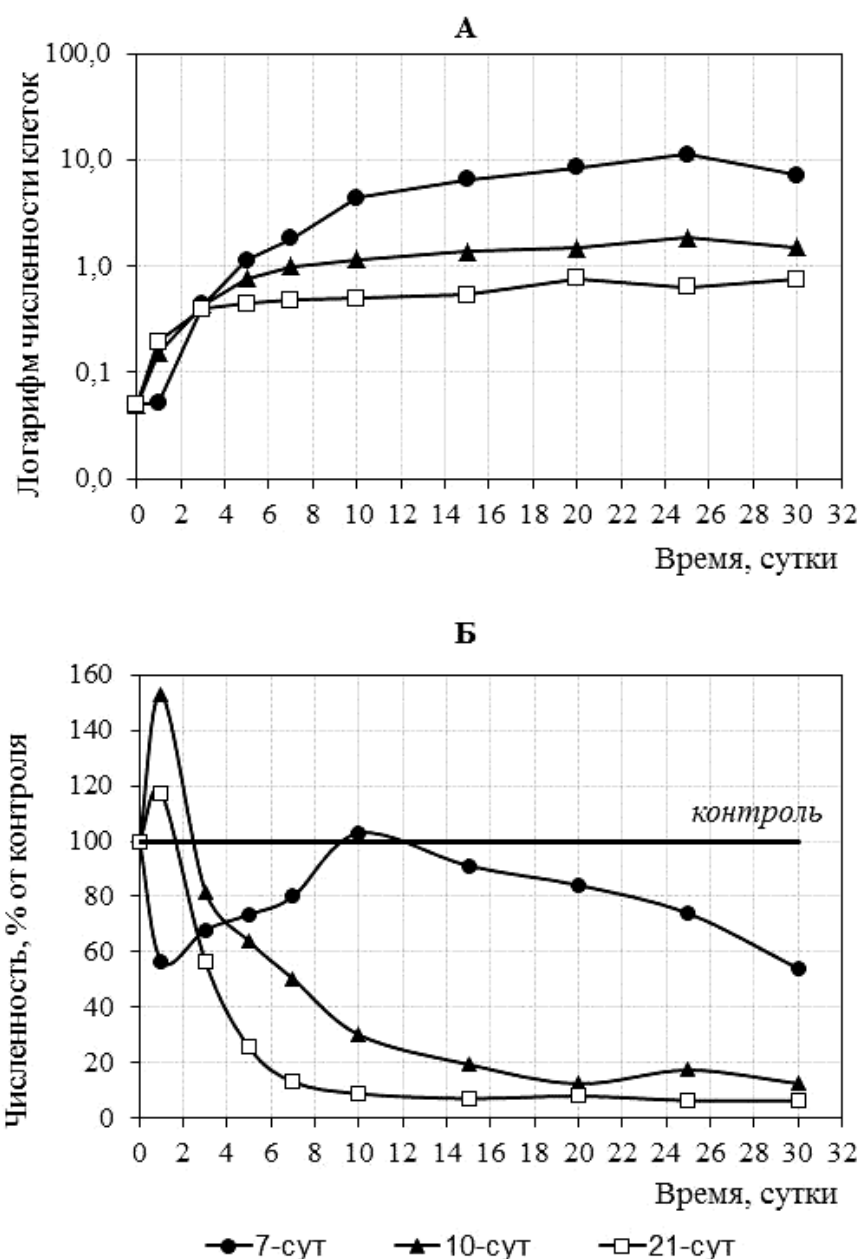


Рисунок 13. Общая (А) и относительная (Б) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* в фильтратах, полученных на разные сутки развития исходной культуры

2- и 7-суточные фильтраты *S. quadricauda* практически не оказывали влияния на рост интактной культуры - численность клеток в них на протяжении всего наблюдения была близкой к контролю (Рисунок 14Б). Развитие *S. quadricauda* в 21- и 30-суточных фильтратах было одинаковым и схожим с развитием *M. arcuatum* в 21- суточном фильтрате: культура *S.*

quadricauda быстро выходила на стационарную стадию роста, и численность клеток в ней практически не увеличивалась (Рисунок 14А).

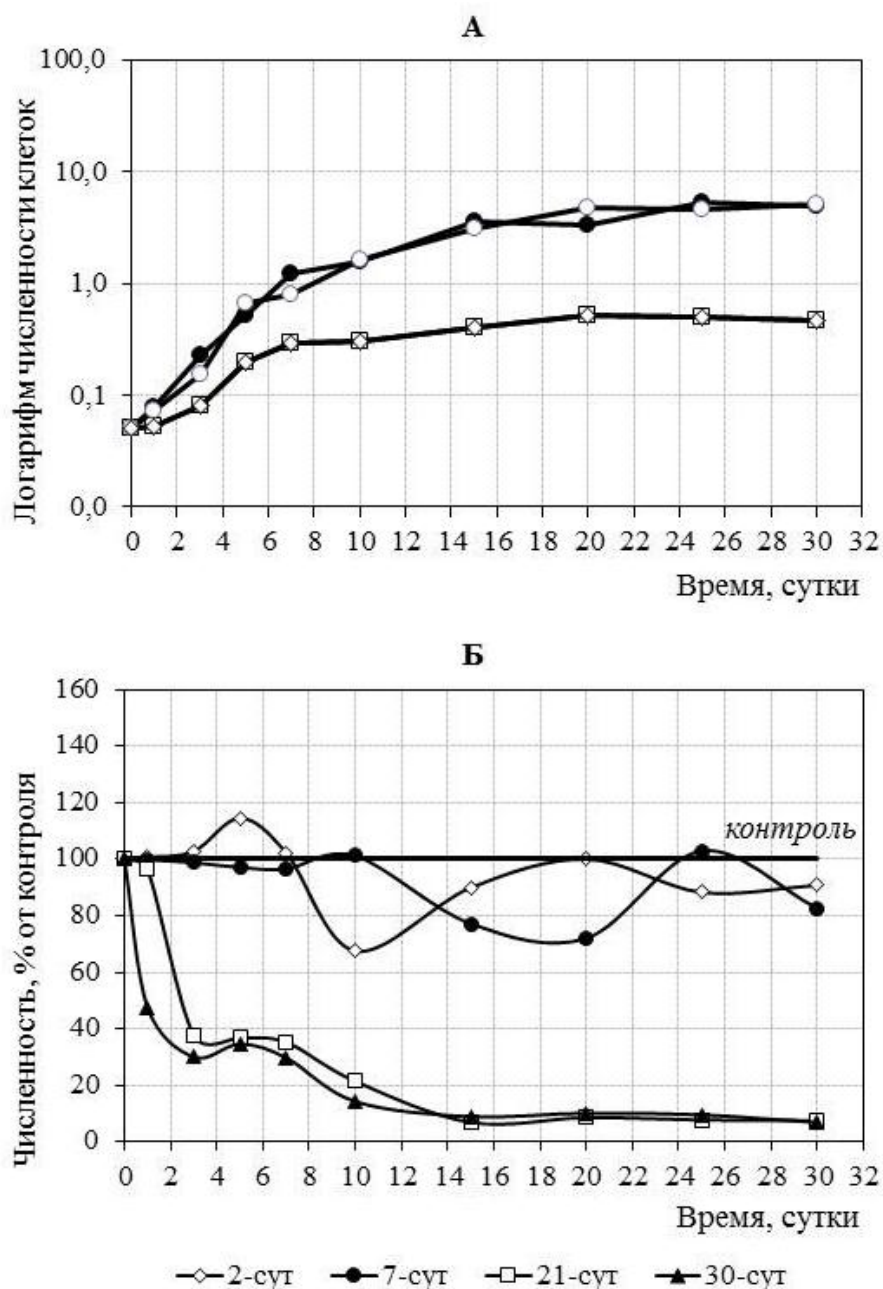


Рисунок 14. Общая (А) и относительная (Б) численность клеток *Scenedesmus quadricauda* в фильтрах, полученных на разные сутки развития исходной культуры

Кроме того, при выращивании культур обоих видов в фильтрах, полученных позже 10 суток, было отмечено изменение морфологии клеток - они становились более крупными и бледными (Рисунок Приложения А).

Однако при этом отмирающих клеток было практически столько же, сколько и в контроле.

Исследования показали, что влияние фильтратов на рост культур *M. arcuatum* и *S. quadricauda* зависело от фазы развития культуры, из которой они были получены. Чем позднее был получен фильтрат, тем более ингибирующее действие он оказывал на развитие обеих культур, и тем более существенным было снижение темпа деления клеток, что приводило к снижению численности к 30 суткам. Чтобы объяснить наблюдаемый эффект, обратимся к росту исходных культур *M. arcuatum* и *S. quadricauda*, из которых были получены фильтраты. В обеих культурах после 10 суток эксперимента наступал спад роста численности, который был началом стационарной фазы. Это может быть связано как с накоплением в среде экзометаболитов, ингибирующих деление, так и со снижением количества питательных веществ. Кроме того, как было установлено с помощью метода микрокультур (раздел 3.6), к 11 суткам эксперимента в культурах обоих видов увеличивается доля покоящихся клеток, которые не участвуют в делении. Известно, что экзометаболиты регулируют рост культуры, стимулируя или ингибируя размножение клеток. В период активного роста клетки водорослей могут образовывать антиоксидантные вещества, способные стимулировать их рост, а также бактерицидные вещества, подавляющие развитие бактериального компонента (Хайлов, 1971). Вероятнее всего, в фильтратах, полученных после 10 суток роста культур *M. arcuatum* и *S. quadricauda* присутствует большое количество метаболитов, под действием которых основная часть клеток перестает делиться, но при этом они продолжают увеличиваться в размерах. О плохом состоянии клеток, находящихся в фильтрате, свидетельствует их слабое свечение в УФ-лучах: они имеют тускло-красное или оранжевое свечение, что указывает на снижение фотосинтетической активности, и, как следствие, на недостаток энергии, необходимый для нормального функционирования. Изменение морфологии клеток может также означать переход культуры к

гетеротрофному питанию за счет уменьшения в среде минеральных веществ и накопления органических метаболитов. В период до 10 суток, когда были получены 2- и 7-суточные фильтраты, исходные культуры обоих видов находились на логарифмической фазе роста, поэтому эти фильтраты могли содержать стимулирующие деление клеток вещества. С другой стороны, они содержали меньше питательных веществ по сравнению с исходной культуральной средой, что могло отразиться на снижении численности клеток при росте в 7-суточных фильтратах на последних сроках наблюдения.

Таким образом, было установлено, что примерно к 10 суткам роста микроводорослей культуральная среда приобретает ингибирующие свойства. В собственных фильтратах разного возраста *M. arcuatum* росла хуже, чем *S. quadricauda*. В частности, стоит отметить большее ингибирование 7-суточным фильтратом роста *M. arcuatum*, что может свидетельствовать о большей чувствительности этой культуры.

3.8. Развитие *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в смешанной культуре

Взаимодействие различных видов микроводорослей может носить разный характер, начиная от нейтральных и симбиотических отношений до состояния жесткой конкуренции. Представители родов *Monoraphidium* и *Scenedesmus* типичны для водоемов разных полушарий, причем часто они встречаются в одном водоеме на протяжении всего года (Ташлыкова Н.А., 2009). Изучение смешанных культур имеет целью выявить чувствительность *M. arcuatum* к присутствию *S. quadricauda*, что может свидетельствовать об их взаимоотношениях в природном фитопланктоне.

Развитие *M. arcuatum* и *S. quadricauda* при совместном культивировании изучали в смешанной двувидовой культуре с разным исходным соотношением численности клеток: 1:1 (25 и 25 тыс. кл./мл) и 9:1 (45 и 5 тыс. кл./мл) (Таблицы 20-23 Приложения А)

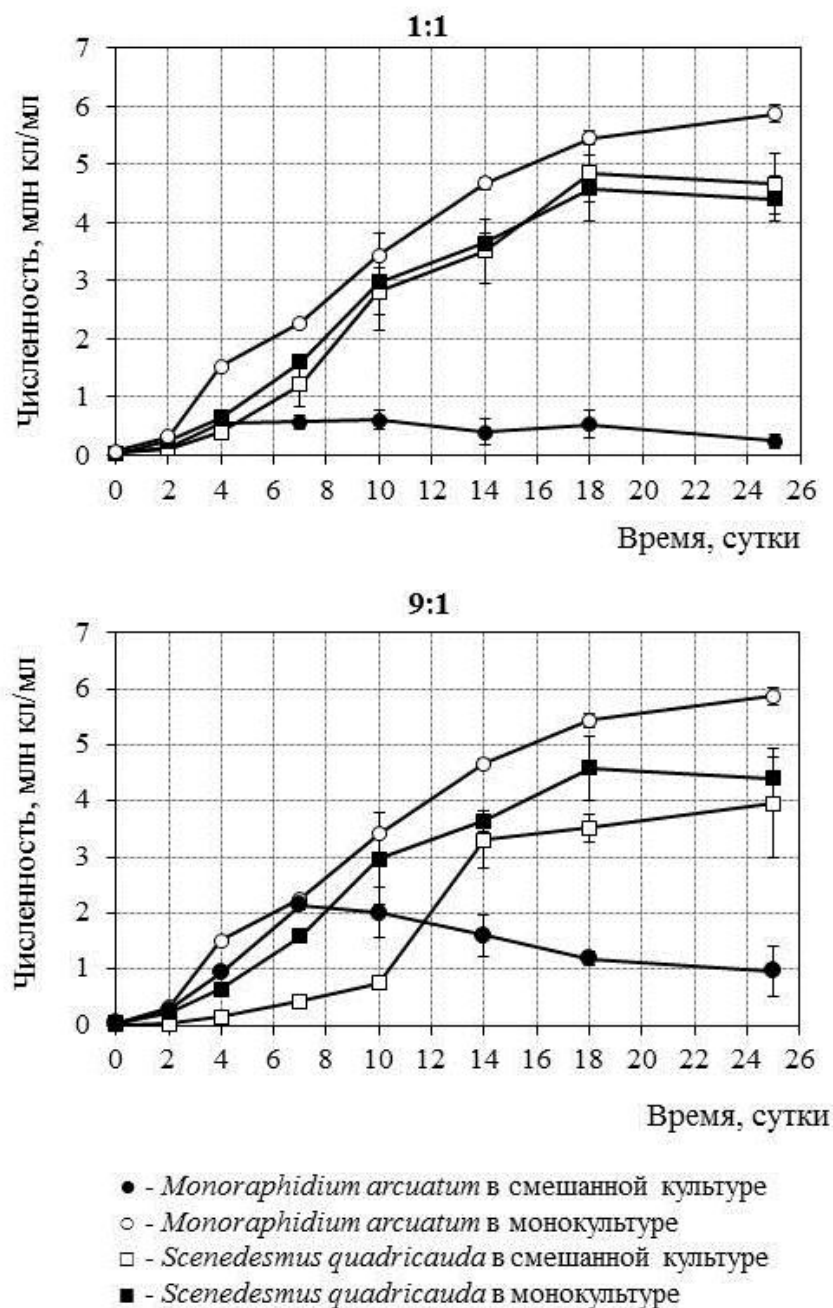


Рисунок 15. Численность клеток *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в смешанной культуре при разном исходном соотношении их численности (1:1 и 9:1)

В смешанной культуре при исходном соотношении численности клеток 1:1, численность *S. quadricauda* начинала преобладать над численностью *M. arcuatum* после 4 суток, а при соотношении численности 9:1 - после 12 суток (Рисунок 15). Угнетение микроводоросли *M. arcuatum* выражалось в значительном уменьшении количества живых клеток,

замедлении темпа их деления и снижении численности. При разном начальном соотношении угнетение *M. arcuatum* начиналось, когда численность *S. quadricauda* достигала довольно близких значений: 38.9 ± 6.4 и 42.5 ± 2.3 дес. тыс. кл. /мл.

Интересно отметить, что через 3 месяца в смешанной культуре, где соотношение клеток разных видов было 9:1, количество клеток *M. arcuatum* возросло относительно количества *S. quadricauda*, а через 9 месяцев культура состояла только из клеток *M. arcuatum*.

Полученные данные позволили рассчитать конкурентный эффект обоих видов при совместном культивировании (Таблица 6). Высокий CE_{SM} по сравнению с CE_{MS} можно объяснить по-разному, например, более быстрым потреблением пищевого ресурса видом *S. quadricauda*. Совместная эксплуатация общего пищевого ресурса разными видами ведет к конкурентным взаимодействиям между ними. Накопление популяцией в смешанных культурах меньшей биомассы по сравнению с монокультурой свидетельствует о той доли лимитирующего ресурса, который изымается популяцией при совместной его эксплуатации (Ильяш, 1998). Доля, на которую снижается биомасса популяции одного вида при совместном культивировании с популяцией другого вида, дает оценку конкурентного эффекта (CE) популяции последнего вида на развитие популяции первого вида.

Таблица 6. Конкурентный эффект *S. quadricauda* (CE_{SM}) и *M. arcuatum* (CE_{MS}) в смешанной культуре

	Состав смешанной культуры	
	1:1	9:1
CE_{SM}	0.979	0.929
CE_{MS}	-0.129	0.092

Кроме того, известно, что скорость потребления биогенных элементов падает с увеличением объема клеток, как показано для природных и лабораторных популяций (Friebele et al., 1978; Wen et al., 1997). Но, поскольку, как было показано ранее, в исследуемых нами культурах клетки *M. arcuatum* и *S. quadricauda* соизмеримы по объему и площади поверхности, то это не может быть причиной наблюдаемого явления. Высокий CE_{SM} может быть достигнут также за счет подавления развития партнеров по совместному росту токсичными прижизненными метаболитами.

Как описано в разделе 3.7, угнетение роста молодой тест-культуры *S. quadricauda* в фильтрах этого же вида было зафиксировано только для 21- и 30-суточных фильтратов, когда численность клеток в культуре, которую фильтровали, достигала уже 300.0 ± 19.6 и 410 ± 19.6 дес. тыс. кл/мл, соответственно. В фильтрате, полученном на 2 сутки эксперимента, когда численность клеток составляла 34.0 ± 1.0 , водоросли развивались в пределах контроля на протяжении всего срока наблюдений (30 суток). Это говорит о том, что при совместном культивировании биогенные элементы быстрее расходуется, причем в основном за счет потребления их клетками *S. quadricauda*. Кроме этого, не исключено, что в присутствии *M. arcuatum* клетки *S. quadricauda* могут раньше и больше выделять в среду экзометаболитов, чем в монокультуре. При достижении численности *S. quadricauda* около 40 дес. тыс. кл/мл (независимо от исходной численности клеток обоих видов в смешанной культуре) экзометаболиты, возможно, накапливаются в достаточном для угнетения роста *M. arcuatum* количестве.

Как было показано (раздел 3.4), при развитии культуры *M. arcuatum* в норме на всех фазах роста преобладают покоящиеся клетки, в отличие от культуры *S. quadricauda*, в которой на фазе логарифмического роста преобладают делящиеся клетки. В таких клетках, которые временно перестают делиться, физиологические изменения направлены на снижение активности метаболизма, поэтому они могут играть важную роль для сохранения популяции при длительном культивировании в накопительном

режиме, в переживании неблагоприятных условий и периодов существенного конкурентного эффекта со стороны других видов. По данным люминесцентной микроскопии (Таблица 24 Приложения А), количество мертвых клеток *M. arcuatum* в смешанной культуре практически не увеличивалось, начиная с 18 суток, и составляло не более 30 %. Это свидетельствует о том, что большинство клеток *M. arcuatum* были покоящимися, то есть не делились.

Обнаружено, что при совместном культивировании в накопительном режиме культура *M. arcuatum* менее конкурентоспособна, чем *S. quadricauda*, однако при этом превосходит *S. quadricauda* по выживаемости. Это может быть связано с особенностями метаболизма *M. arcuatum*, приспособленного к получению биогенных элементов из альтернативных источников, например, за счет щелочных фосфатаз (Smith, Kalff, 1981), а также с тем, что большинство клеток в популяции находятся в неделящемся состоянии. Из полученных данных можно заключить, что культура *M. arcuatum* обладает высокой чувствительностью к абиотическому фактору, что стало еще одним аргументом в пользу ее дальнейшего изучения с точки зрения пригодности для целей биотестирования.

ГЛАВА 4. Развитие культуры *Monoraphidium arcuatum* при воздействии бихромата калия

Для характеристики нового тест-объекта необходимо определение его чувствительности к эталонному токсиканту бихромату калия, уровень чувствительности к которому позволяет принять решение о возможности использования культуры в токсикологических исследованиях (Wang, 1987; ГОСТ Р 54496-2011).

В течение ряда лет (2010-2014 гг.) были проведены длительные эксперименты по изучению роста культуры *M. arcuatum* в присутствии разных концентраций бихромата калия в колбах и во флаконах. О влиянии токсиканта судили по изменению численности и физиологическому состоянию клеток (последнее определяли с помощью люминесцентной микроскопии). Показателем токсического воздействия также служило изменение структурно-физиологической гетерогенности культур, которое определяли по способности клеток к выживанию и размножению в условиях интоксикации с помощью метода микрокультур (Филенко и др., 2004; Марушкина, 2005), позволяющего контролировать состояние и развитие отдельных клеток.

Объектом для сравнения и подтверждения уровня чувствительности *M. arcuatum* служила культура *S. quadricauda*, об особенностях развития которой и чувствительности к токсическим воздействиям, в том числе к бихромату калия, накоплен богатый материал (Ицзюнь, 1994; Ипатова и др., 2011).

4.1. Токсичность бихромата калия для культуры *Monoraphidium arcuatum*

Воздействие бихромата калия на культуру *M. arcuatum* первоначально изучали в колбах, как рекомендовано в большинстве методических пособий по биотестированию. Бихромат калия в концентрациях 0.1, 1.0 и 10 мг/л добавляли в культуры с разной исходной плотностью инокулята и в разные сезоны (80 тыс. кл/мл в мае 2010 года и 55 тыс. кл/мл в августе 2011)

(Таблицы 2, 3, 6 Приложения А).

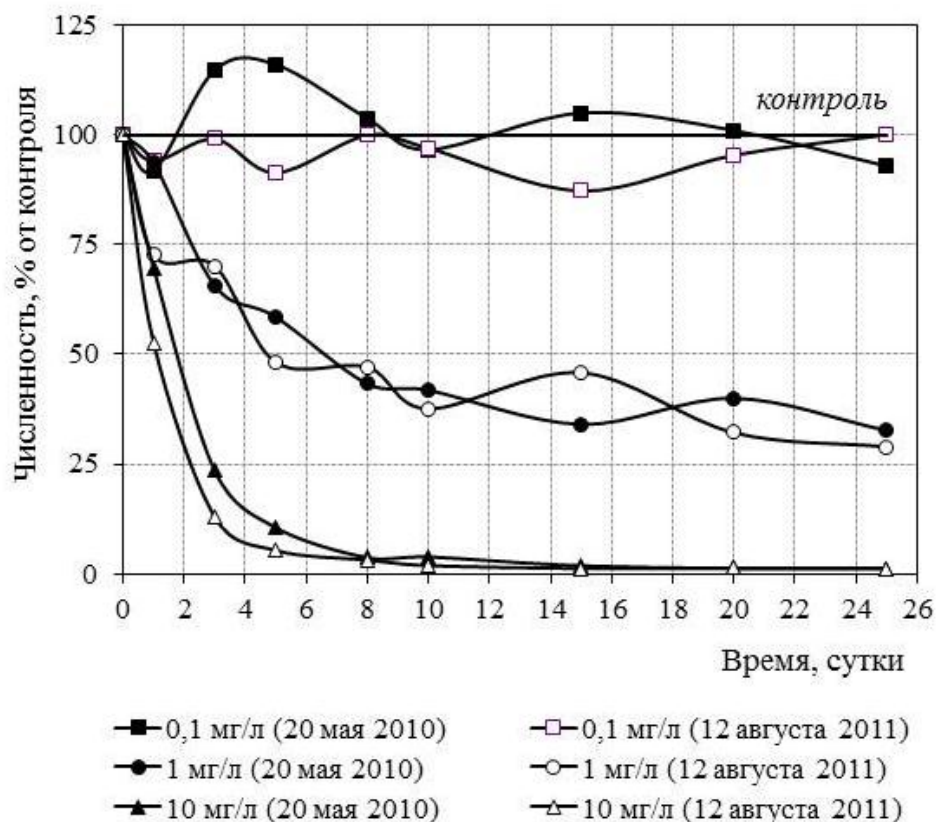


Рисунок 16. Относительная численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при воздействии бихромата калия в разные сезоны года

В обоих экспериментах численность клеток *M. arcuatum* изменялась сходным образом и не зависела от сезона (Рисунок 16). При концентрации 0,1 мг/л бихромата калия общая численность и численность живых клеток на протяжении всего эксперимента были в пределах контроля. Относительная численность клеток в обоих экспериментах колебалась с чередующимися снижениями и подъемами.

Концентрация бихромата калия 1 мг/л, начиная уже с 3 суток, вызывала достоверное снижение численности *M. arcuatum*, а после 5 суток - заметное увеличение количества мертвых клеток (до 20 % к 33 суткам) (Таблица 6а Приложения А). Кроме того, у большинства клеток были отмечены морфологические изменения, такие как уменьшение размеров, неправильная форма и появление вздутий (Рисунок Приложения А).

При действии бихромата калия в концентрации 10 мг/л на культуру *M. arcuatum* наблюдалось резкое снижение относительной численности клеток в течение первых 6-8 суток (Рисунок 17). Это было связано с тем, что в контроле численность клеток увеличивалась, тогда как в опыте в течение всего эксперимента она оставалась практически неизменной (Рисунок 18). По данным люминесцентной микроскопии, уже на 8 сутки культура на 90 % состояла из мертвых клеток, а к 33 суткам эксперимента живые клетки, которые могли делиться и поддерживать численность популяции, составляли всего 1 % от общей численности (Таблица 6а Приложения А). При этом клетки *M. arcuatum* не изменялись в размерах, оставаясь мелкими, такими, как при постановке эксперимента. Длительные наблюдения показали, что клетки *M. arcuatum* в присутствии 10 мг/л бихромата калия сохранялись в течение более 3 месяцев, однако свечение таких клеток при ультрафиолетовом облучении (в люминесцентном микроскопе) отсутствовало, по крайней мере, уже через 2 месяца. Наблюдаемые признаки (постоянство численности, сохранность клеток и отсутствие свечения) свидетельствуют, на наш взгляд, об отсутствии или сильном замедлении лизиса клеток.

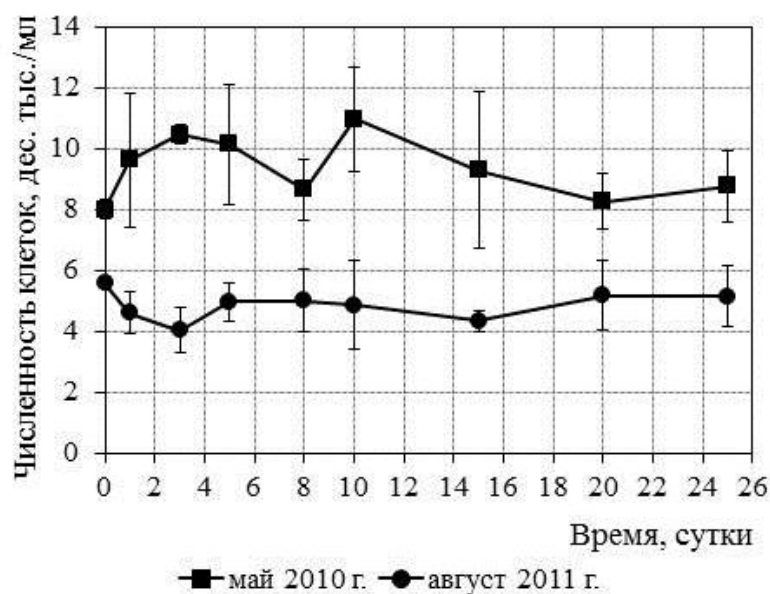


Рисунок 18. Численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при действии 10 мг/л бихромата калия в разные сезоны года

В таблице 7 приведены значения количества клеточных делений в сутки в присутствии бихромата калия в разные периоды роста культуры *M. arcuatum*. Поскольку при подсчете численности учитывали как живые, так и мертвые клетки, значения скоростей деления были пересчитаны с учетом данных люминесцентной микроскопии для живых клеток, чтобы исключить заведомо неделящиеся клетки. Количество клеточных делений при 0.1 мг/л бихромата калия за равные промежутки времени было близким к контролю и схожим образом сокращалось по мере увеличения общей численности клеток. При воздействии бихромата калия в концентрации 1 мг/л темп деления клеток в целом был несколько ниже, чем в контроле. В присутствии 10 мг/л бихромата калия клетки не делились.

Таблица 7. Количество клеточных делений *Monoraphidium arcuatum* в сутки (v) при воздействии разных концентраций бихромата калия **в пересчете на живые клетки**

Концентрация бихромата калия (мг/л)	Срок (в сутках)			
	0 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 33
0 (Контроль)	0.55±0.02	0.09±0.02	0.04±0.01	0.01±0.01
0.1	0.55±0.02	0.07±0.04	0.06±0.04	0.02±0.02
1	0.40±0.02	0.14±0.04	-0.07±0.04	0.00±0.02
10	-0.11±0.07	-0.55±0.23	-0.22±0.34	-0.25±0.20

Для выявления возможности восстановления культуры *M. arcuatum* после интоксикации, водоросли, которые в течение 53 суток находились в среде с бихроматом калия, отмывали от токсиканта и пересевали в чистую среду (исходная плотность – 4.5±1.5 дес. тыс. кл/мл). За развитием культуры в чистой среде наблюдали 22 суток, в течение которых численность клеток увеличивалась во всех вариантах опыта, но с разной скоростью (Таблица 8).

Таблица 8. Количество клеточных делений в сутки (ν) в культуре *Monoraphidium arcuatum* при воздействии бихромата калия и после пересева в чистую среду

Концентрация бихромата калия (мг/л)	ν при действии бихромата калия	Пересев в чистую среду	ν после пересева клеток в чистую среду
К	0.31 ± 0.01	→	0.23 ± 0.05
0.1	0.31 ± 0.01	→	0.26 ± 0.04
1	0.23 ± 0.01	→	0.35 ± 0.11
10	-0.01 ± 0.01	→	0.60 ± 0.09

У клеток, находившихся в течение 53 суток в среде с 0.1 мг/л бихромата калия, после пересева в чистую среду темп деления замедлялся по сравнению с темпом деления при интоксикации и был соизмерим с таковыми при воздействии 1 мг/л бихромата калия. Самый быстрый темп деления был отмечен у клеток, которые ранее находились в присутствии 10 мг/л (Таблица 8).

Таким образом, токсичность бихромата калия для культуры *M. arcuatum* прямо пропорциональна его концентрации и практически не зависит от исходной плотности инокулята в диапазоне 50 – 80 тыс. кл/мл. Кроме того, время (сезон) постановки эксперимента влияло только на численность клеток, тогда как на чувствительность культуры к бихромату калия существенного влияния не оказывало. Минимальная из испытанных концентраций - 0.1 мг/л - была на уровне пороговой. Бихромат калия в концентрации 1 мг/л снижал численность клеток на 50 – 65 % относительно контроля, что сопровождалось снижением количества живых клеток и скорости их деления, а также изменением морфологии клеток. При добавлении 10 мг/л бихромата калия происходила остановка роста и

размножения клеток и быстрая гибель. Чем выше и, соответственно, токсичнее была начальная концентрация бихромата калия, тем интенсивнее при пересеве в чистую среду клетки *M. arcuatum* восстанавливали численность, и тем более значительным было ее увеличение. Скорее всего, при действии остротоксичных концентраций бихромата калия происходит генетическая адаптация популяции, в результате которой выживают наиболее резистентные клетки, которые в целом более жизнеспособны.

Чувствительность *M. arcuatum* к действию бихромата калия, оцениваемую по минимальной действующей концентрации, можно считать сходной с чувствительностью *S. quadricauda* (Артюхова и др., 1997). Численность клеток *S. quadricauda* при действии низких концентраций бихромата калия (до 1 мг/л включительно) колебалась в обе стороны относительно контроля, тогда как при больших концентрациях (3, 6 и 10 мг/л) численность на протяжении 30 суток была ниже, что сопровождалось также существенным снижением количества живых клеток. Авторы отмечают увеличение ширины клеток *S. quadricauda*, которое было особенно выражено при воздействии 1-3 мг/л бихромата калия.

4.2. Влияние типа емкости на токсический эффект бихромата калия

Как было установлено ранее (см. раздел 3.2), скорость деления клеток *M. arcuatum* в процессе развития культуры в колбах в норме обычно снижалась быстрее, чем во флаконах, поэтому постановка эксперимента в разных емкостях может также оказывать влияние на чувствительность культуры к токсическому воздействию. В связи с этим в июне 2014 года исследовали воздействие бихромата калия в концентрациях 0.5, 1.0 и 2.5 мг/л на культуру *M. arcuatum* в колбах и во флаконах одновременно. На рисунке 19 представлено изменение численности клеток в обоих типах емкостей относительно контроля (Таблицы 7, 8 Приложения А).

В каждой из испытанных концентраций значения численности клеток *M. arcuatum* были близкими в колбах и во флаконах на протяжении 17 суток

наблюдений (Рисунок 19). Бихромат калия в концентрациях 0.5 и 1 мг/л вызывал достоверное снижение численности на 20 - 40 % и 50 – 80 % относительно контроля, при этом после 4-6 суток происходило небольшое восстановление численности, которое было более выражено в колбах. При действии 2.5 мг/л бихромата калия наблюдалось торможение деления клеток уже на начальных этапах интоксикации, что на рисунке выглядит как резкое снижение численности относительно контроля в первые 2 суток. В течение всего эксперимента численность *M. arcuatum* практически не изменялась относительно исходной, но клетки увеличивались в размерах, появлялись клетки с включениями (Рисунок Приложения А).

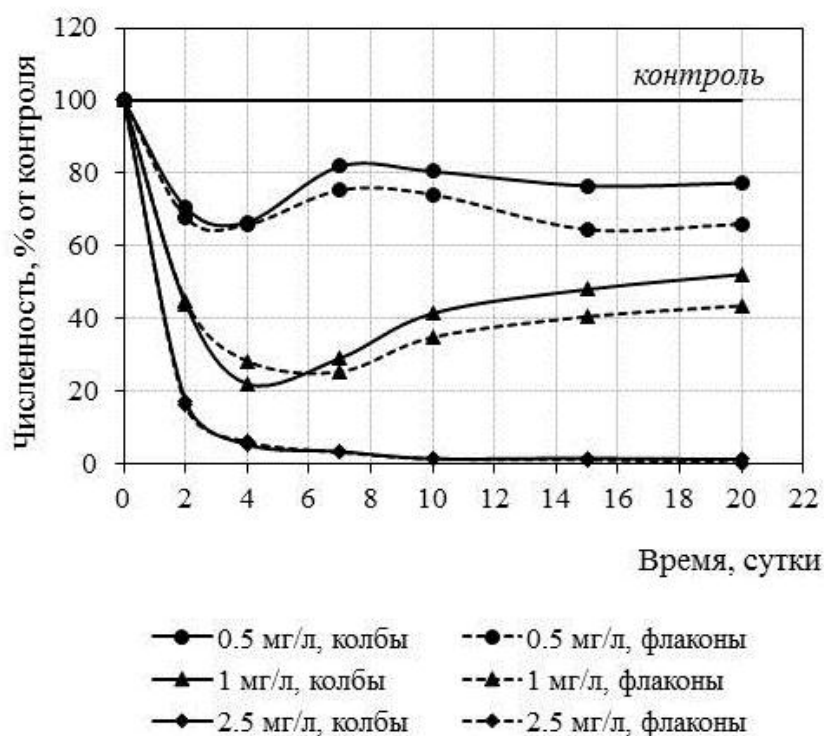


Рисунок 19. Относительная численность клеток *Monoraphidium arcuatum* в колбах и флаконах при воздействии бихромата калия

По данным люминесцентной микроскопии, культура *M. arcuatum* при действии 0.5 и 1 мг/л бихромата калия сохраняла физиологическую активность на протяжении всего срока наблюдений – живых клеток в ней содержалось не менее 93 % как в колбах, так и во флаконах (Таблицы 7а, 8а

Приложения А). При действии же 2.5 мг/л токсиканта количество мертвых клеток увеличивалось после 4 суток, а к 20 суткам их доля преобладала (до 80 %). Стоит отметить тенденцию к повышению гибели клеток при воздействии бихромата калия на *M. arcuatum* во флаконах особенно к концу эксперимента.

Изучение соотношения живых и мертвых клеток в культуре при интоксикации подтверждают большую чувствительность *M. arcuatum* к бихромату калия во флаконах по сравнению с колбами.

Таким образом, при постановке эксперимента во флаконах чувствительность культуры *M. arcuatum* к бихромату калия повышалась.

Поскольку в работе было проведено много экспериментов с одними и теми же концентрациями бихромата калия в разные сезоны года, в разных типах емкостей и при неконтролируемых внешних факторах, мы рассчитали показатель сходимости численности клеток культуры *M. arcuatum* в разных экспериментах при действии одинаковых концентраций токсиканта (0.1, 0.5, 1, 2.5 и 10 мг/л). Исходные данные представлены в Приложении (Таблицы 6-8 Приложения А). Согласно метрологическим требованиям при оценке сходимости результатов коэффициент вариации не должен отклоняться от нормы более, чем на 30 % при величине $p=0.05$ (ГОСТ Р 54496-2011; РД 118-02-90). Данные расчета показали, что коэффициент вариации численности клеток не превышал 15 %. Это означает, что культура *M. arcuatum*, растущая в рекомендованных методиками лабораторных условиях и надлежащим способом подготовленная к эксперименту, обладает достаточно постоянной чувствительностью к бихромату калия, мало зависящей от внешних факторов.

4.3. Влияние степени синхронизации на чувствительность культуры *Monoraphidium arcuatum* к бихромату калия

Чувствительность к бихромату калия определяли у однократно и дважды синхронизированной культуры *M. arcuatum* в колбах при исходной плотности 50 тыс. кл/мл и дополнительно у дважды синхронизированной культуры при исходной плотности 20 тыс. кл/мл (Таблицы 18, 19 Приложения А).

Как видно из Рисунка 20, численность клеток в дважды синхронизированных культурах *M. arcuatum* снижалась относительно контроля при действии всех испытанных концентраций бихромата калия.

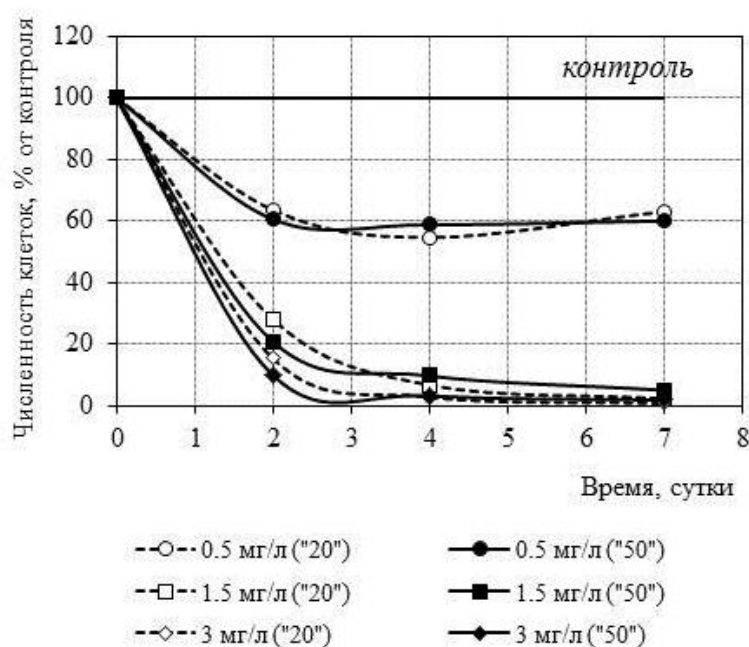


Рисунок 20. Относительная численность *Monoraphidium arcuatum* в дважды синхронизированной культуре с разной исходной численностью клеток (20 тыс. и 50 тыс. кл/мл) при действии бихромата калия

При разной исходной численности клеток в культуре, бихромат калия в концентрации 0.5 мг/л вызывал снижение численности относительно контроля на 40 %, а при добавлении 1.5 мг/л и, в особенности, 3 мг/л токсиканта численность клеток к 7 суткам составляла не более 3 % от контроля, т.е. рост культуры практически отсутствовал.

Влияние степени синхронизации на чувствительность культуры *M. arcuatum* определяли по ее реакции на добавление в среду 0.5 мг/л бихромата калия (Рисунок 21).

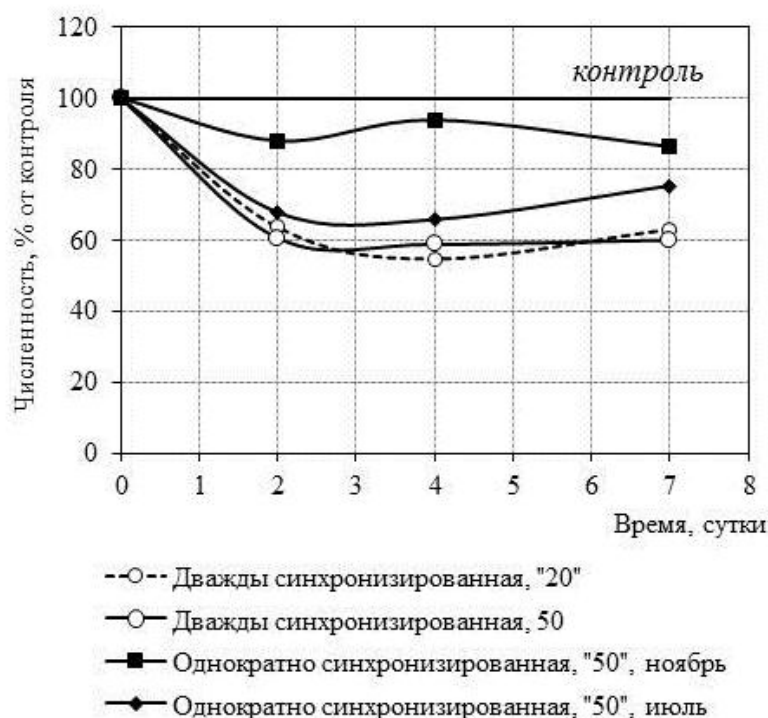


Рисунок 21. Относительная численность клеток в культуре *Monoraphidium arcuatum* с разной степенью синхронизации и исходной плотности культуры при воздействии 0.5 мг/л бихромата калия при

Оказалось, что дважды синхронизированная культура *M. arcuatum* обладала большей чувствительностью к действию бихромата калия, чем однократно синхронизированная, что может быть связано с уменьшением ее гетерогенности после повторной синхронизации. Существует мнение (Брагинский, Сиренко, 1971), что «молодые» клетки микроводорослей более чувствительны к действию токсикантов, чем более старые, «зрелые» клетки. При двукратной синхронизации в культуре преобладают именно «молодые» клетки, что объясняет наибольшую чувствительность культуры.

Для дважды синхронизированной культуры ЛК₅₀ за 48 часов составила 0.67-0.78 мг/л, за 96 часов – 0.51-0.58 мг/л. Близкой к ней по чувствительности оказалась однократно синхронизированная культура в июле – 0.7-0.9 мг/л, наиболее устойчивой была однократно

синхронизированная культура в ноябре 2013 г. Различие в исходной численности клеток (в диапазоне 20-50 тыс. кл/мл) не повлияло на результат опыта.

4.4. Структура популяции *Monoraphidium arcuatum* при воздействии бихромата калия

Изменение структуры популяции *M. arcuatum* при воздействии бихромата калия (0.1, 1.0 и 10 мг/л) изучали с целью оценки функционального состояния культуры в процессе развития при интоксикации. Для этого определяли количество делившихся, покоящихся и отмерших клеток в микрокультурах, которые получали из макрокультуры *M. arcuatum* на 1, 8, 15 и 36 сутки эксперимента.

Контрольная культура *M. arcuatum* на протяжении всего эксперимента была представлена преимущественно покоящимися клетками. При наступлении стационарной фазы роста их количество увеличивалось (Рисунок 22А). Больше всего делящихся клеток (42 %) было отмечено на 8 сутки эксперимента.

На начальном этапе интоксикации (1-4 сутки) в присутствии 0.1 мг/л бихромата калия, в отличие от контроля, в популяции *M. arcuatum* преобладали делящиеся клетки (около 62 %) (Рисунок 22Б). По мере развития культуры их доля снижалась, а количество покоящихся клеток увеличивалось. В конце эксперимента (36-39 сутки) мертвые клетки практически отсутствовали, что соответствует данным, полученным с помощью люминесцентной микроскопии для макрокультуры (Таблица 6а Приложения А). Наблюдаемые колебательные изменения количества делящихся клеток объясняют такой же характер изменения численности клеток в макрокультуре относительно контроля (см. 4.1).

Бихромат калия в концентрации 1 мг/л приводил к значительному изменению структуры популяции *M. arcuatum*: почти все клетки переходили в покоящееся состояние (до 94 % к концу эксперимента). В период 8-11 суток

отмерших клеток стало значительно больше, а делящихся почти не осталось (Рисунок 22В). Далее, к 15-18 и 36-39 суткам, популяция состояла только из покоящихся (75-80 %) и мертвых клеток (20–25 %).

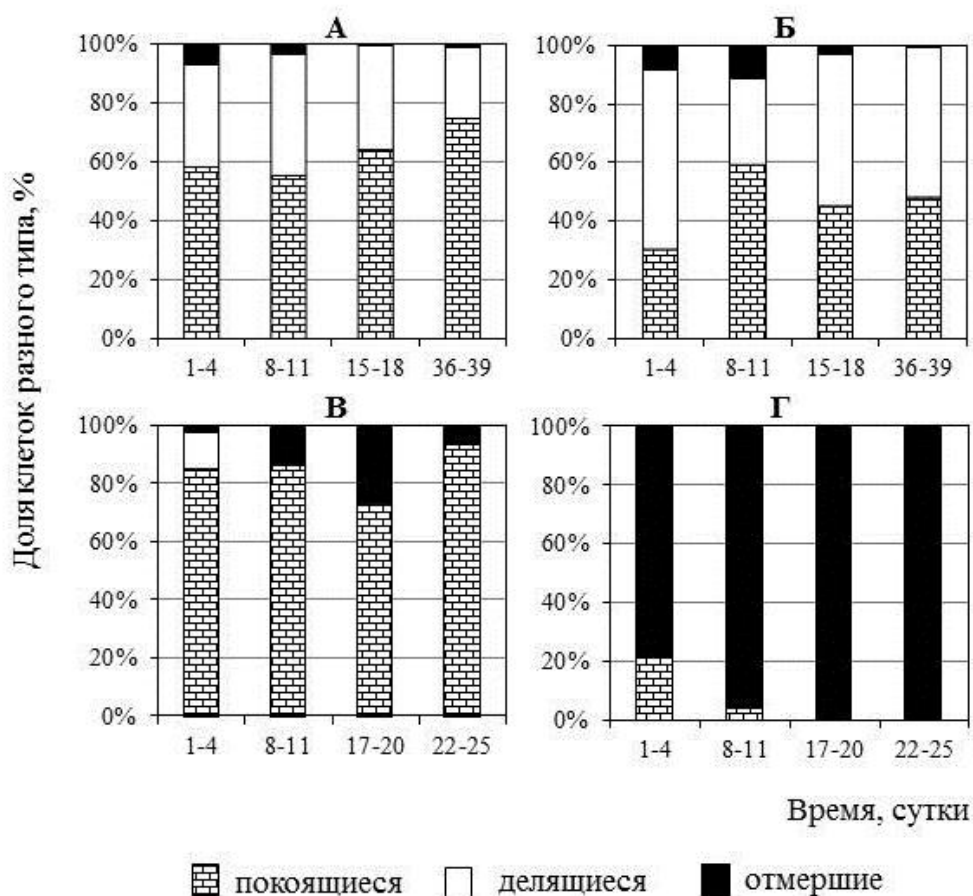


Рисунок 22. Структура популяции *Monoraphidium arcuatum* в контроле (А) и при действии бихромата калия в концентрациях 0.1 мг/л (Б), 1 мг/л (В) и 10 мг/л (Г)

Токсичность бихромата калия в концентрации 10 мг/л проявилась уже в первые сутки наблюдений, когда до 75 % клеток погибло, а оставшая часть популяции *M. arcuatum* была представлена покоящимися клетками (Рисунок 22Г). В дальнейшем их доля снижалась, в то время как количество отмерших клеток увеличивалось. После 15 суток делящиеся и покоящиеся клетки в микрокультурах не были обнаружены под люминесцентным микроскопом, мы не можем утверждать о полном отсутствии живых клеток в культуре в это время. Во-первых, потому что относительное постоянство численности клеток в макрокультуре на всех этапах эксперимента говорит в пользу их

присутствия. А во-вторых, по данным люминесцентной микроскопии, в макрокультуре к концу эксперимента живые клетки были обнаружены в количестве не более 1 % от исходной численности, что соответствует 400-500 кл/мл. При таком низком содержании живых клеток в макрокультуре вероятность того, что они попадут в микрокультуру, очень невелика.

Таким образом, концентрация 0.1 мг/л не только не вызывала значительных изменений в структуре популяции *M. arcuatum* (так же как и в динамике ее численности), но даже увеличила процент делящихся клеток в процессе развития культуры. При действии 1 мг/л происходила перестройка структуры популяции с тенденцией к переходу клеток в состояние покоя и увеличению количества мертвых клеток. Популяция *M. arcuatum* при действии максимальной из испытанных концентраций – 10 мг/л – состояла в основном из отмерших клеток, и только на начальных этапах развития в ней в небольшом количестве присутствовали покоящиеся клетки.

4.5. Развитие *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в смешанной культуре при воздействии бихромата калия

Исследование воздействия бихромата калия на смешанные культуры *M. arcuatum* и *S. quadricauda* при разном исходном соотношении численностей (9:1 и 1:1) в обоих случаях выявило высокую чувствительность к данному веществу. Смешанная культура состава 9:1, в которой изначально было больше клеток *M. arcuatum*, оказалась немного устойчивее к действию бихромата калия ($ЛК_{50}$ составляла 0.92 мг/л за 24 ч и 0.82 мг/л за 48 ч) по сравнению с культурой с соотношением численностей 1:1 ($ЛК_{50}$ составляла 0.97 за 24 ч и 0.72 мг/л за 48 ч). Несмотря на то, что изменение общей численности в смешанных культурах при разном исходном соотношении культур в контроле происходило сходным образом, реакция на бихромат калия в концентрации 1 мг/л значительно различалась уже после 15 суток эксперимента (Рисунок 23).

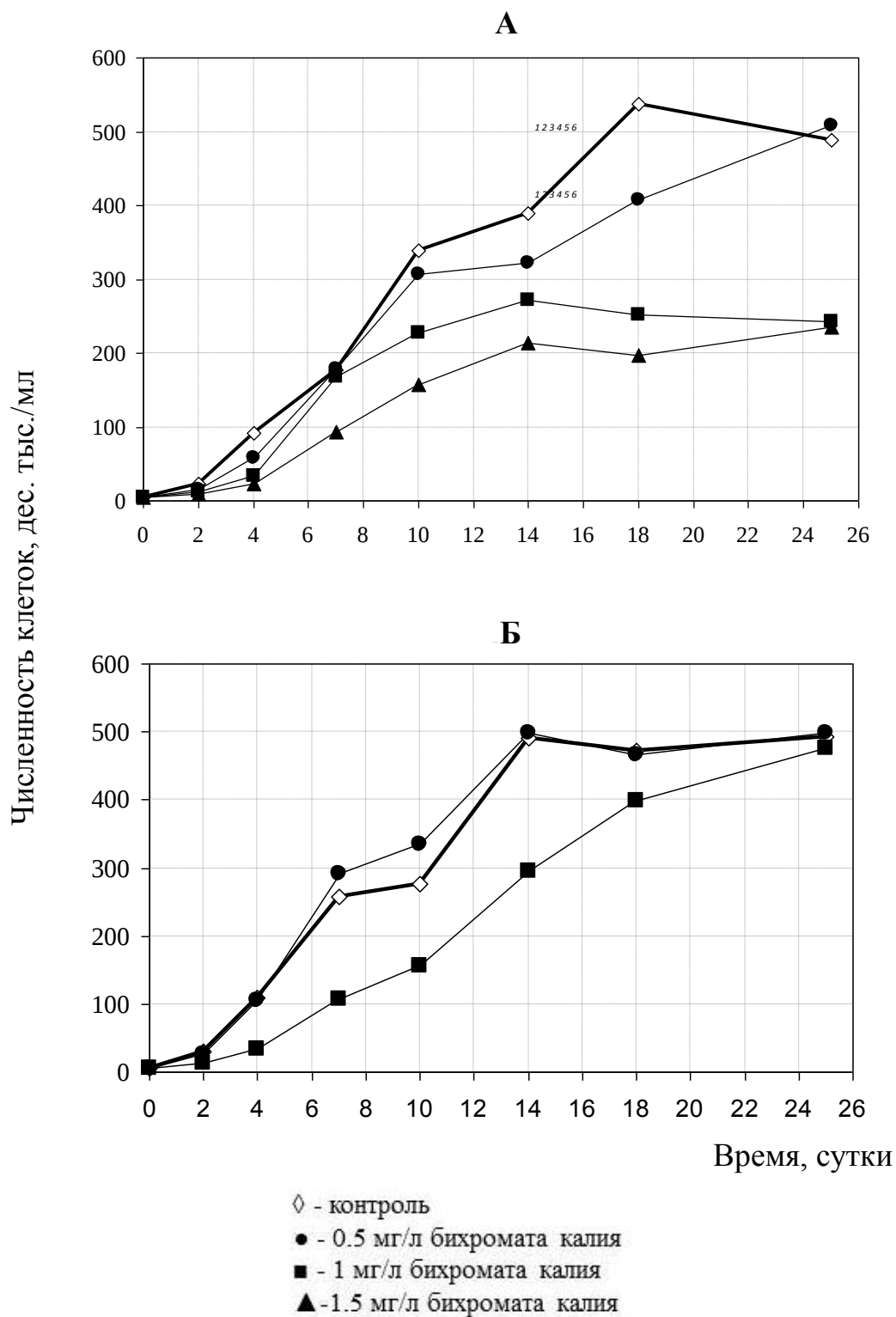


Рисунок 23. Общая численность клеток *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в смешанных культурах с исходным соотношением численности 1:1 (А) и 9:1 (Б) при воздействии бихромата калия (0.5, 1.0 и 1.5 мг/л)

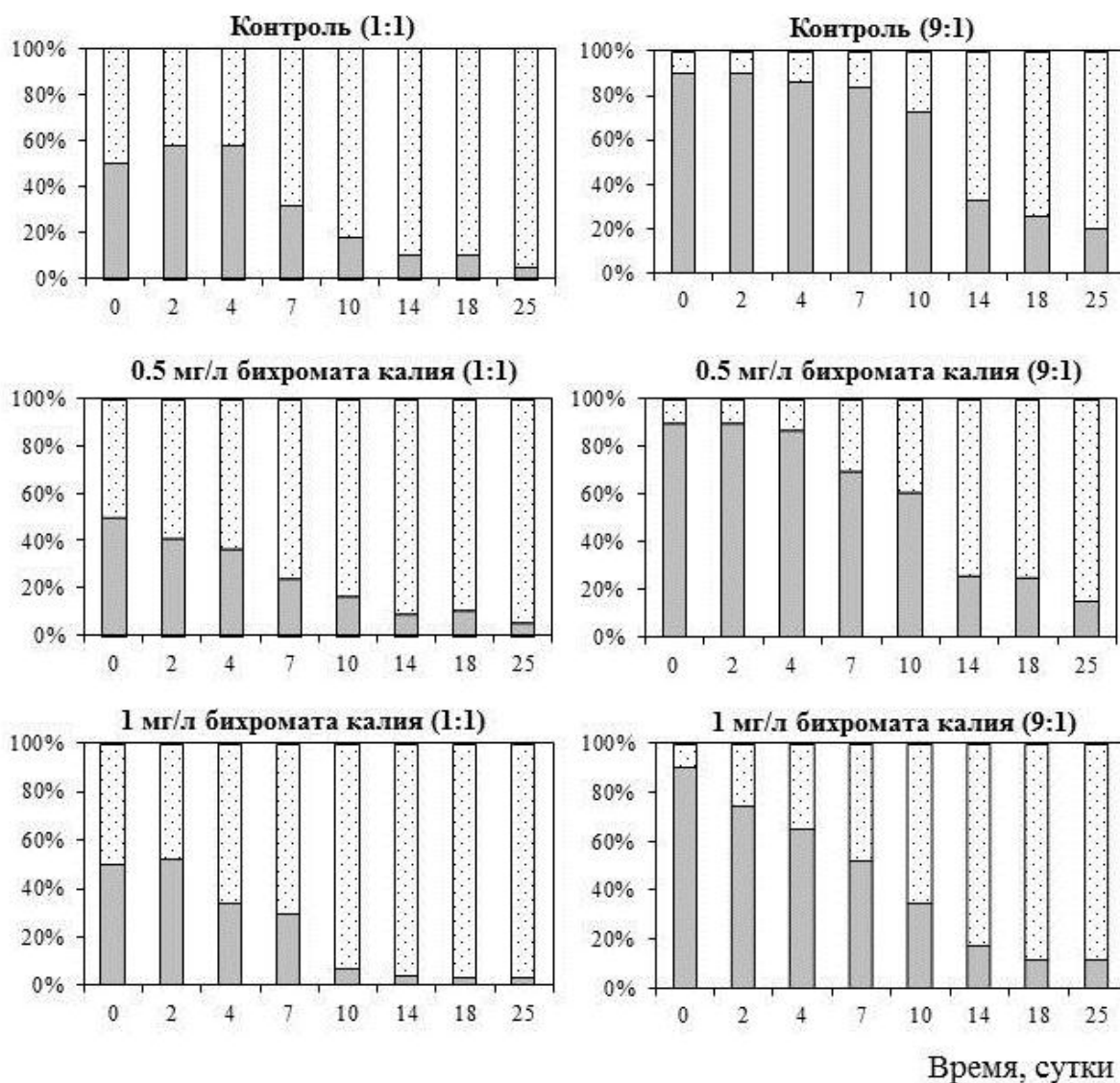


Рисунок 24. Соотношение численностей *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в смешанных культурах (в %) с разным исходным соотношением их численности (9:1 и 1:1) при действии бихромата калия

На Рисунке 24 представлено изменение соотношения численности *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в смешанных культурах с разным исходным содержанием клеток каждого вида. Во всех вариантах наблюдалось вытеснение вида *M. arcuatum* видом *S. quadricauda*, которое происходило быстрее при соотношении клеток 1:1. Кроме того, добавление бихромата калия в смешанную культуру увеличивало скорость замещения *M. arcuatum* клетками *S. quadricauda*. Это говорит о более высокой по сравнению со *S. quadricauda* чувствительности *M. arcuatum* к токсическому воздействию и о влиянии загрязнения на видовую структуру фитопланктона.

Таким образом, исследование токсичности бихромата калия выявило высокую чувствительность культуры *M. arcuatum* к данному токсиканту, сопоставимую с чувствительностью контрольной тест-культуры *S. quadricauda*. Было установлено, что токсическое действие бихромата калия на *M. arcuatum*, прямо пропорционально его концентрации и выражается в снижении численности и гибели клеток, замедлении или полном ингибировании процессов их деления, в изменении структуры популяции. Полулетальная концентрация (ЛК₅₀) бихромата калия за 48 часов составляет 0.67-4.53 мг/л, за 72 – 0.55-2.39 мг/л, за 96 ч – 0.51-1.89 мг/л. Концентрация 0.1 мг является пороговой (минимально действующая концентрация, МДК), 2.5 мг/л – остротоксичной, а 10 мг/л – летальной. Чувствительность *M. arcuatum* повышается при постановке эксперимента во флаконах по сравнению с колбами, а при повторной синхронизации, наоборот, понижается, по сравнению с однократной, и не зависит от сезона.

Полученные данные по чувствительности *M. arcuatum* к бихромату калия свидетельствует о пригодности данной культуры для целей биотестирования. Основываясь на результатах наших исследований, рекомендуемая исходная плотность культуры *M. arcuatum* при биотестировании составляет 20 – 50 тыс. кл/мл.

ГЛАВА 5. Развитие культур *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при воздействии коллоидного серебра

В последние годы все большее применение находят различные наноматериалы, среди которых одним из наиболее часто применяемых является серебро. Благодаря бактерицидным свойствам его добавляют в текстильные изделия, наружные краски, косметику, зубную пасту и другие товары потребления. Сообщается о присутствии в природных пресных водах отдельных наночастиц серебра и их агломератов (Chinnapongse et al., 2011). В рамках исследования эффектов разных форм серебра на гидробионты в лаборатории водной токсикологии, где выполнялась данная работа, изучали влияние коллоидного наносеребра на микроводоросли.

Очень часто в литературе приводятся результаты исследований по изучению токсичности серебра для водорослей в краткосрочных опытах, длительностью от нескольких часов до нескольких суток. Однако токсический эффект может проявиться со временем, что экспериментально выявляется только в хронических испытаниях.

В связи с недостаточным количеством данных о токсичности коллоидного серебра, было изучено его влияния на рост и структуру лабораторных популяций хлорококковых водорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в длительных экспериментах.

Помимо определения токсичности коллоидного серебра и его воздействия на рост и структуру популяции, определяли токсичность фильтратов культур, разное время контактировавших с серебром, а также возможное восстановление популяции клеток после интоксикации.

5.1. Токсичность коллоидного серебра для культур *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda*

Главной задачей этого раздела было определение диапазона токсических концентраций коллоидного серебра для микроводорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda*. Эксперимент проводили параллельно на обеих культурах при

концентрациях токсиканта 0.1-0.0001 мг/л (Таблицы 4, 5 Приложения А).

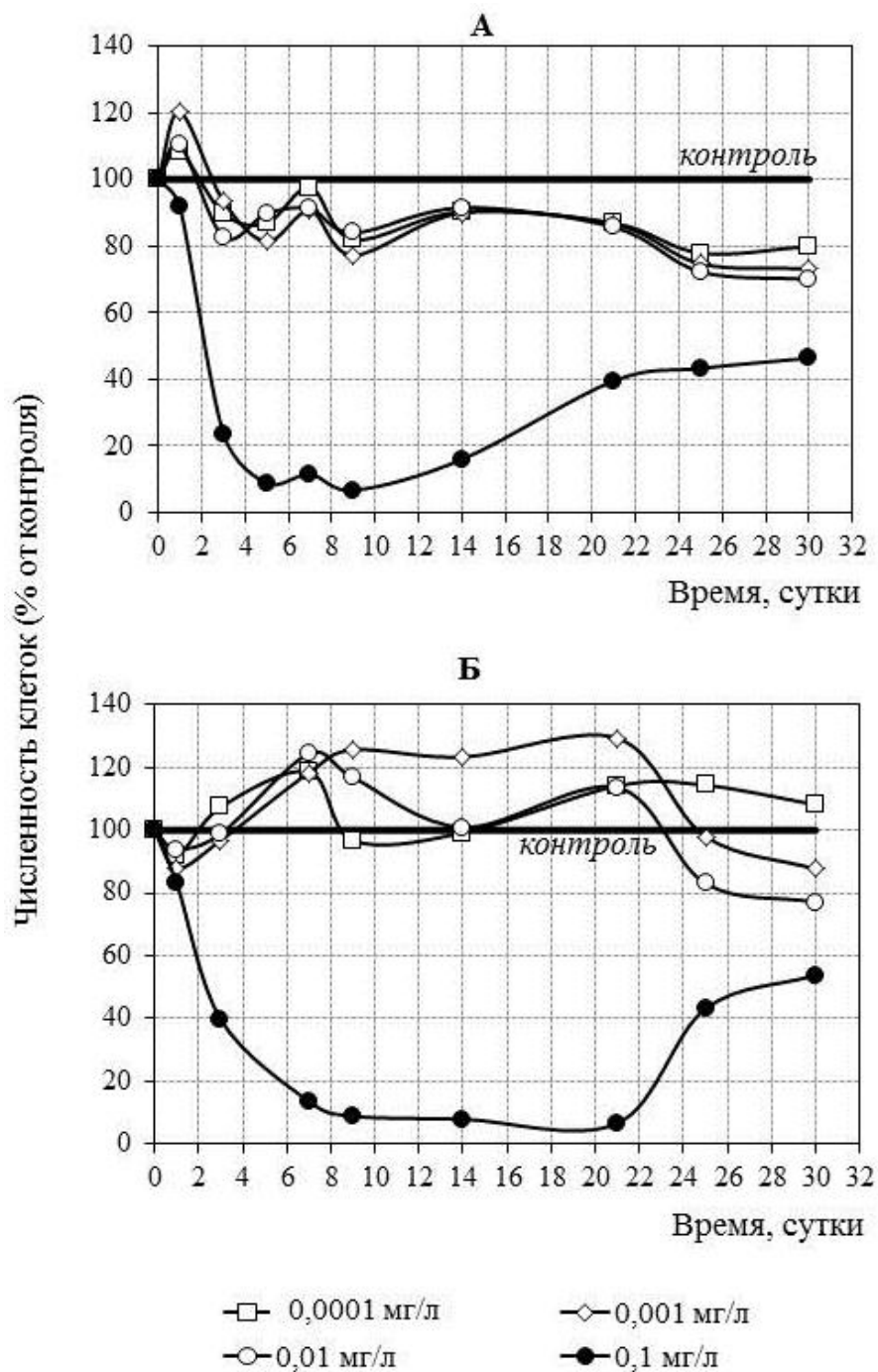


Рисунок 25. Относительная численность клеток *Monoraphidium arcuatum* (А) и *Scenedesmus quadricauda* (Б) при действии коллоидного серебра в концентрациях 0.0001 (□), 0.001 (Δ), 0.01 (○), 0.1 (●) мг/л

Для культуры *M. arcuatum* в первые сутки роста отмечено незначительное увеличение численности клеток относительно контроля при 0.01, 0.001 и 0.0001 мг/л коллоидного серебра (до 20 % при 0.001 мг/л), но в дальнейшем она всегда

была ниже (Рисунок 25А). Концентрация 0.1 мг/л вызывала резкое снижение относительной численности (до 6.8 % от уровня контроля на 9 сутки эксперимента), что было связано с гибелью почти всех клеток. Однако после периода ингибирования, который длился 9 суток, численность клеток постепенно увеличивалась и на 30 сутки составляла уже 46.4 % от значения численности в контроле.

Реакция культуры *S. quadricauda* на добавление коллоидного серебра была иной. Относительная численность клеток *S. quadricauda* при 0.0001, 0.01 и в особенности 0.001 мг/л коллоидного серебра возрастала в период до 21 суток (Рисунок 25Б). К концу эксперимента численность клеток при концентрациях 0.001 и 0.01 мг/л была на 15-25 % ниже уровня контроля, а при 0.0001 мг/л, наоборот, была несколько выше. Коллоидное серебро в концентрации 0.1 мг/л вызывало длительное снижение относительной численности клеток *S. quadricauda*, которое было более продолжительным, чем в культуре *M. arcuatum*. Численность клеток начинала возрастать только после 21 суток эксперимента, тогда как у *M. arcuatum* - уже после 9 суток.

Таким образом, численность клеток *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в присутствии 0.01, 0.001 и 0.0001 мг/л коллоидного серебра на протяжении всего опыта в целом изменялась в пределах контроля (уровень колебаний составлял $\pm$ 20–30 %), но у *M. arcuatum* была ниже, чем в контроле, тогда как у *S. quadricauda*, наоборот, выше.

Концентрация 0.1 мг/л была высокотоксичной для обеих культур и вызывала существенное снижение численности клеток относительно контроля, длительную лаг-фазу и массовую гибель клеток (до 98%) (Таблицы 4а, 5а Приложения А). Продолжительность лаг-фазы у *M. arcuatum* была короче, чем у *S. quadricauda* (9 против 21 суток), что может быть следствием более интенсивного деления клеток *M. arcuatum*. Однако низкие по сравнению со *S. quadricauda* численности клеток при действии малых концентраций, свидетельствуют о большей чувствительности культуры *M. arcuatum* к коллоидному серебру.

В литературе эффект восстановления после воздействия наночастиц серебра в концентрации 0.1 мг/л описан для нитчатой зеленой водоросли *Pithophora oedogonia*, у которой спустя 30 суток возобновлялся рост молодых нитей (Dash et al., 2012).

Токсичность серебра в ионной форме (AgNO_3 , Ag_2SO_4) для *S. quadricauda* подробно описана в работе Т. В. Бойчук (Бойчук, 2007). При концентрации 0.1 мг Ag^+ /л выявлено длительное (30 суток) токсическое и одновременно альгостатическое действие серебра. Это позволяет высказать суждение, что серебро в ионной форме (макроформа) более токсично, чем в наноразмерном состоянии в коллоидном растворе.

5.2. Влияние типа емкости на токсический эффект коллоидного серебра

Для изучения влияния емкости культивирования *M. arcuatum* и *S. quadricauda* на токсический эффект серебра в концентрации 0.1 мг/л был проведен эксперимент в колбах и во флаконах (Таблицы 4, 5, 9 Приложения А).

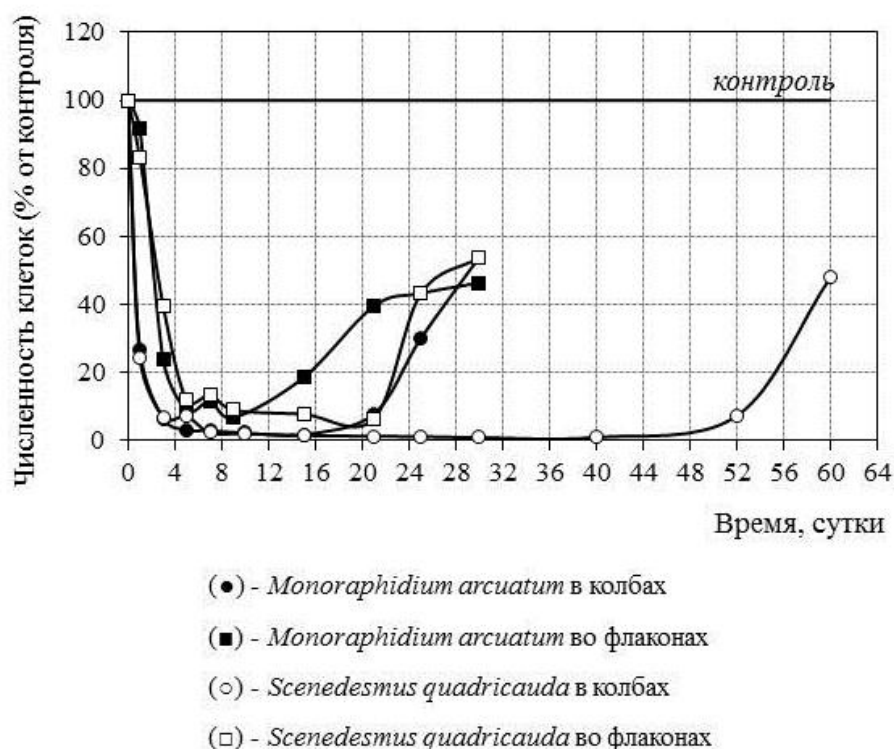


Рисунок 26. Относительная численность клеток *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при 0.1 мг/л коллоидного серебра в емкостях разного типа

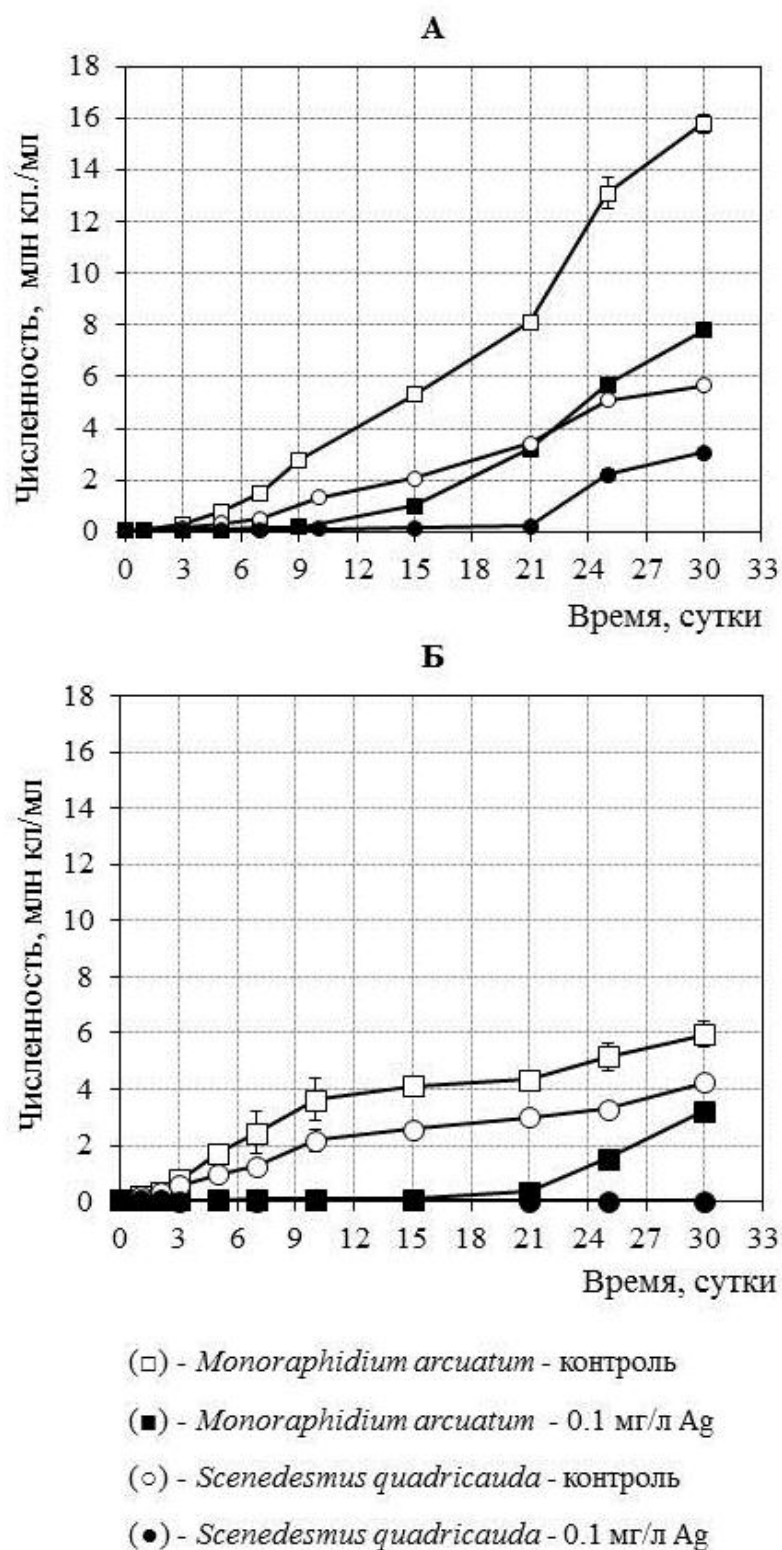


Рисунок 27. Численность клеток *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при 0.1 мг/л коллоидного серебра во флаконах (А) и в колбах (Б)

Реакция на серебро у культур обоих видов в колбах была сходной с реакцией, которую наблюдали при выращивании во флаконах (раздел 5.1). При добавлении к водорослям коллоидного серебра происходило такое же резкое снижение относительной численности, сопровождавшееся гибелью основной части популяции (по данным люминесцентной микроскопии оставалось не более 2 % живых клеток), после чего через некоторое время численность начинала восстанавливаться (Рисунок 26, 27). Для восстановления численности клеток в колбах требовалось больше времени: 16 суток для *M. arcuatum* и 45 - для *S. quadricauda*, что вдвое превышает эти сроки при постановке эксперимента во флаконах. Увеличению общей численности в культурах обоих видов при воздействии 0.1 мг/л серебра предшествовало увеличение количества живых клеток (Таблицы 4а, 5а, 9а Приложения А).

Для того, чтобы лучше понять причины наблюдаемого явления, обратимся к развитию водорослей в контрольных культурах: численность клеток *M. arcuatum* во флаконах, начиная с 10 суток, была достоверно выше, чем в колбах, а на 30 сутки превышала ее уже вдвое (Рисунок 27). Для культуры *S. quadricauda* значительных различий в росте в разных емкостях отмечено не было вплоть до 20 суток, после которых численность во флаконах стала превышать численность в колбах в 1.5 раза.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что время, которое требуется для преодоления последствий интоксикации коллоидным серебром в концентрации 0.1 мг/л, зависит от интенсивности роста культуры. При добавлении наночастиц серебра к *M. arcuatum* и *S. quadricauda* только около 2 % клеток оставались живыми. На протяжении периода ингибирования численность клеток обеих культур не увеличивалась, что свидетельствует об альгицидном и альгостатическом, а также о консервирующем действии серебра на водоросли.

Скорее всего, концентрация коллоидного серебра в среде с водорослями снижалась за счет его поглощения клетками, адсорбции на стенках сосудов и связывания с метаболитами, а также за счет изначально более устойчивых клеток, не погибших при первом контакте с токсикантом.

Таким образом, токсический эффект коллоидного серебра для *M. arcuatum* и *S. quadricauda* зависит от типа емкости. Серебро в концентрации 0.1 мг/л для обеих культур более токсично при постановке эксперимента в колбах, что выражается в увеличении лаг-фазы вдвое.

5.3. Изменение токсичности культуральной среды в процессе развития *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в присутствии коллоидного серебра

Для решения поставленной задачи оценивали токсичность фильтратов опытных культур *M. arcuatum* и *S. quadricauda*, росших при добавлении 0.1 мг/л коллоидного серебра, с помощью интактных культур каждого вида, которые выращивали отдельно в течение 5-7 суток и одновременно инокулировали в фильтраты опытных культур и в чистую среду. Фильтрацию проводили на 2, 5, 7, 10, 21 сутки роста опытных культур и дополнительно для *S. quadricauda* на 30 сутки, поскольку в это время у него продолжалась лаг-фаза. Полученные фильтраты были условно названы 2-, 5-, 7-, 10-, 21- и 30-суточными фильтратами по времени их получения.

Помимо этого исследовали способность клеток к восстановлению после интоксикации. Клетки, полученные после фильтрации опытных культур и условно названные «опытными» клетками, переносили в чистую среду. Контролем служил рост интактных клеток в чистой среде.

5.3.1. Изменение токсичности культуральной среды *Monoraphidium arcuatum* в присутствии коллоидного серебра

При развитии интактной культуры *M. arcuatum* в фильтратах, полученных после 2, 5 и 7 суток интоксикации среды коллоидным серебром (0.1 мг/л), наблюдалась короткая лаг-фаза (около 2 суток), тогда как в остальных фильтратах, так же, как и в контроле, рост начинался сразу (Рисунок 28А). Во всех исследованных фильтратах на протяжении всего эксперимента численность *M. arcuatum* была ниже, чем в контроле (Рисунок 28Б).

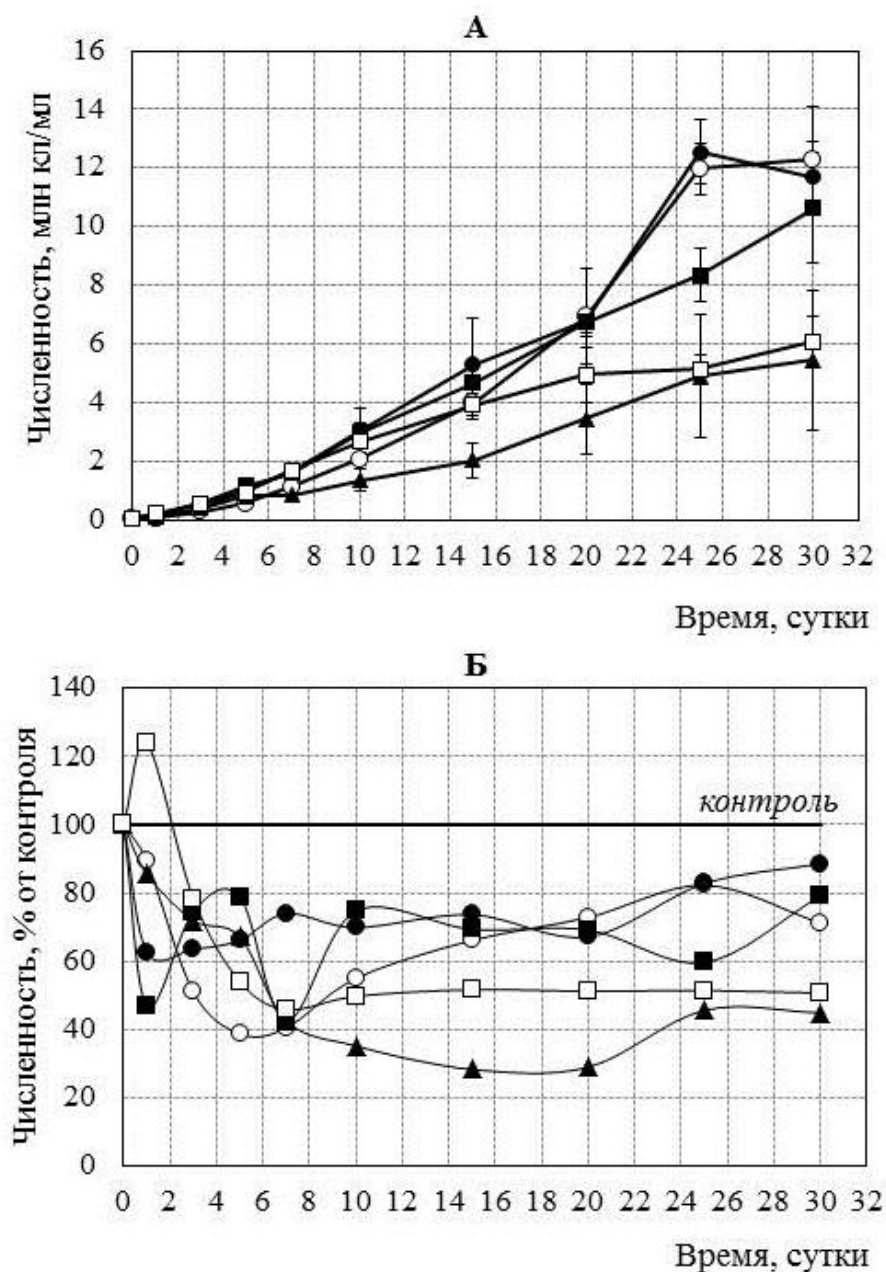


Рисунок 28. Общая (А) и относительная (Б) численность интактных клеток *Monoraphidium arcuatum* в фильтратах культур, полученных после их интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2 (○), 5 (■), 7 (●), 10 (▲), 21 (□) суток

Наибольшее снижение относительной численности наблюдалось в 10- и 21-суточных фильтратах – уже после 5 суток и до конца эксперимента она была снижена относительно контрольной более, чем на 50 %. При развитии *M. arcuatum* в 2-суточном фильтрате в первые 8 суток роста численности клеток сначала снижалась до 40 % от уровня контроля, но к 30 суткам отличалась от него

не более, чем на 25 %. 5- и 7-суточные фильтраты оказывали сходное ингибирующее действие на рост культуры: численность клеток составляла 50-75 % от уровня контроля на протяжении практически всего эксперимента, а к 30 суткам – 80-90 %.

Таким образом, при развитии интактной культуры *M. arcuatum* в 2, 5, 7-суточных фильтратах численность клеток к 30 суткам была ближе к уровню контроля, чем в 10 и 21-суточных фильтратах. По-видимому, токсичность фильтратов, полученных до 7 суток, обусловлена присутствием в них серебра, количество которого снижалось к концу эксперимента, тогда как токсичность фильтратов, полученные позже, увеличивалась со временем из-за вторичного попадания серебра в среду из клеток, истощения питательного ресурса среды и накопления ингибирующих рост метаболитов.

Тем не менее, токсичность всех фильтратов для интактной культуры *M. arcuatum* была ниже, чем токсичность коллоидного серебра, добавленного в питательную среду в день постановки опыта. Снижение токсичности фильтратов может происходить за счет связывания или поглощения серебра клетками.

При изучении способности клеток *M. arcuatum* к восстановлению после интоксикации наблюдалась выраженная лаг-фаза, которая зависела от времени контакта с коллоидным серебром (Рисунок 29А). Наиболее длительной (10 суток) она была после 5, 7 и 10 суток интоксикации, более короткой (5 суток) - после 2-суточной интоксикации, а самая короткая лаг-фаза (3 суток) наблюдалась после 21-суточной интоксикации. Однако численность клеток к 30 суткам во всех вариантах была ниже, чем в контроле, на 30 % (Рисунок 29Б). Таким образом, клетки *M. arcuatum* при пересеве в чистую среду восстанавливали численность сходным образом и практически до одного уровня вне зависимости от продолжительности контакта с коллоидным серебром.

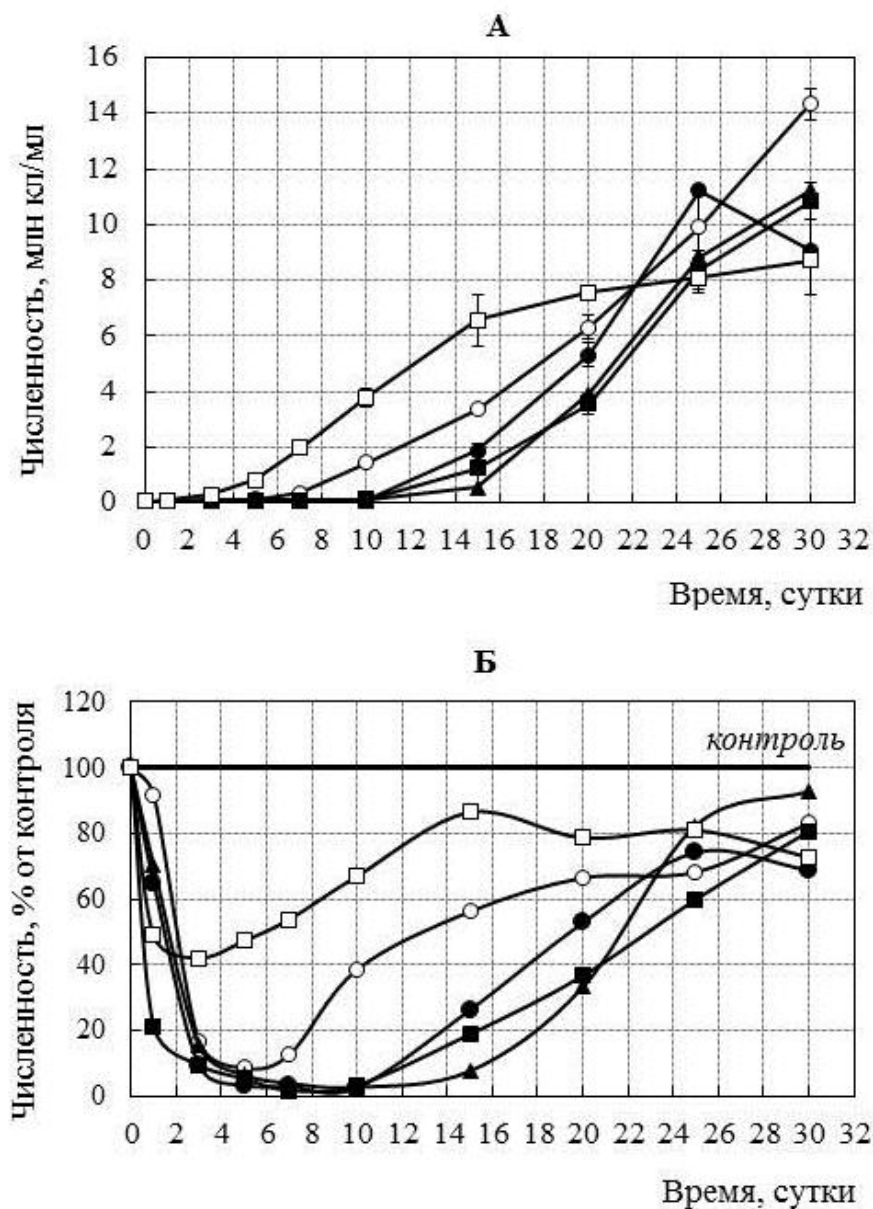


Рисунок 29. Общая (А) и относительная (Б) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при развитии в чистой среде после интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2 (○), 5 (■), 7 (●), 10 (▲), 21 (□) суток

Полученные данные говорят о том, что продолжительность лаг-фазы зависит от количества живых клеток в опытной культуре на момент пересева в чистую среду. Так, более короткую лаг-фазу у клеток после 2 суток интоксикации по сравнению с клетками, пересеянными позже, можно объяснить тем, что в опытной культуре *M. arcuatum* на 2 сутки было 30 % живых клеток, тогда как до 10 суток опыта включительно - всего 1-2 %. Хотя такое же количество живых клеток, как после 2-суточной интоксикации, отмечали и на 21 сутки эксперимента

(32 %), лаг-фаза при пересеве в чистую среду в первом случае была длиннее, чем во втором. Это скорее всего связано с остаточным количеством серебра в клетках или на их поверхности после 2-суточной интоксикации, тогда как в 21-суточной культуре уже прошел отбор резистентных клеток, которые на момент пересева находились в активном состоянии.

Таким образом, токсичность среды снижается в процессе развития *M. arcuatum* в присутствии 0.1 мг/л коллоидного серебра. По-видимому, максимальное снижение токсичности среды (детоксикация) происходит за счет быстрого связывания и поглощения серебра клетками в начальный период интоксикации и сопровождается гибелью большинства клеток (до 98 %). Токсичность среды до 7 суток эксперимента связана с присутствием в ней серебра, количество которого вследствие связывания клетками снижается к концу эксперимента. Однако после 7 суток среда также остается токсичной, что, возможно, обусловлено вторичным попаданием серебра из клеток, уменьшением количества биогенов и накоплением метаболитов, ингибирующих рост микроводорослей.

Механизмами детоксикации среды могут быть как адсорбция частиц серебра на поверхности клеток *M. arcuatum*, и в дальнейшем - поступление в клетку, так и связывание частиц с внеклеточными метаболитами или компонентами среды.

5.3.2. Изменение токсичности культуральной среды *Scenedesmus quadricauda* в присутствии коллоидного серебра

Развитие интактной культуры *S. quadricauda* в фильтратах разного возраста происходило в целом сходным образом (Рисунок 30). В 2-, 5-, 7- и 10-суточных фильтратах рост интактной культуры сопровождался небольшой (2-3 сут) лаг-фазой (Рисунок 30А) и уменьшением относительной численности клеток в этих фильтратах на начальном этапе наблюдений (Рисунок 30Б). Численность клеток в 21-суточном фильтрате изменялась с незначительными колебаниями в пределах контроля на протяжении всего эксперимента, тогда как в 30-суточном фильтрате

она все время была ниже, но не более, чем на 30 % (Рисунок 30Б). К 30 суткам численность *S. quadricauda* во всех испытанных фильтрах достигала уровня контроля.

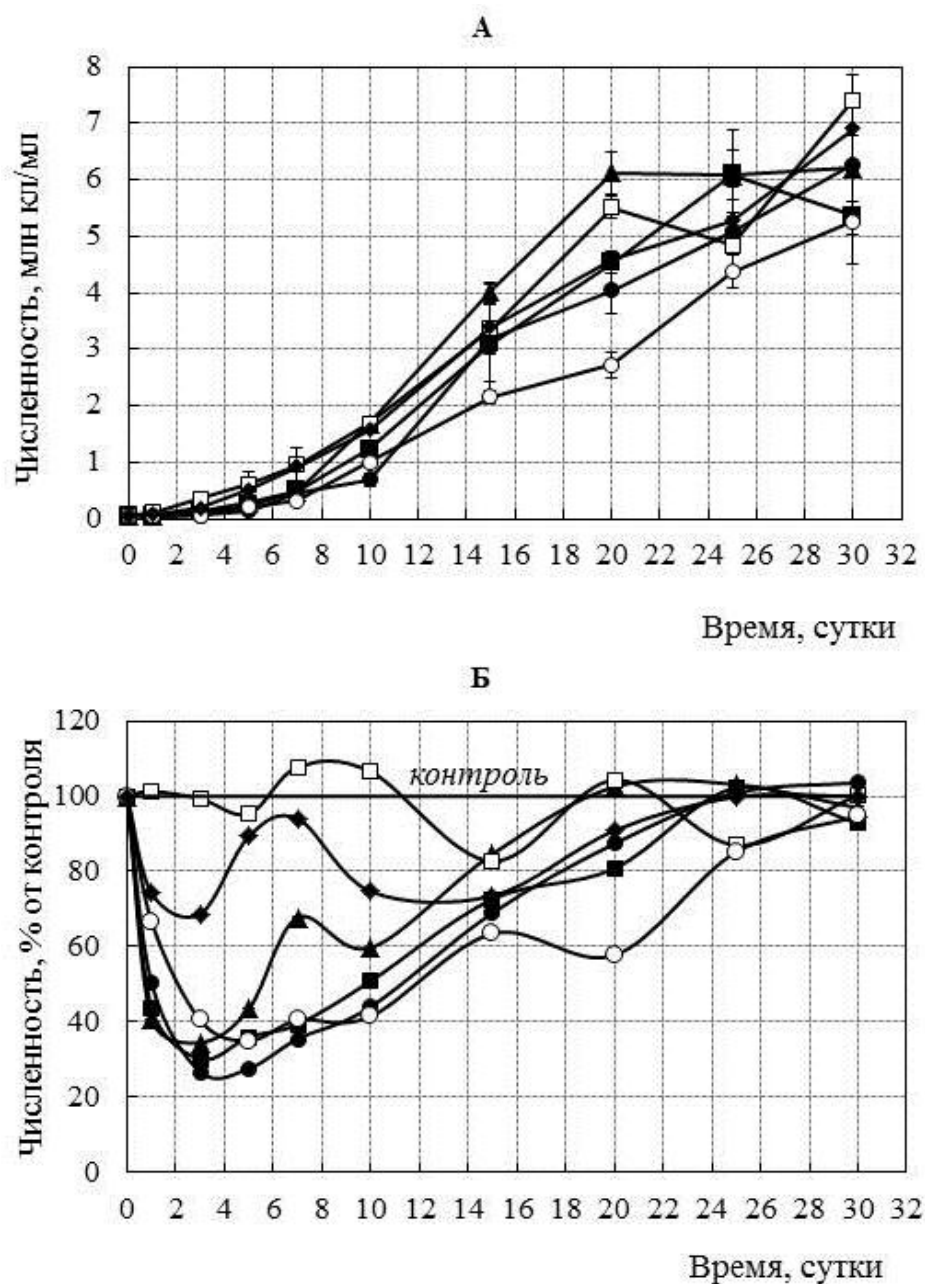


Рисунок 30. Общая (А) и относительная (Б) численность клеток *Scenedesmus quadricauda* в фильтрах культур, полученных после интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2 (○), 5 (■), 7 (●), 10 (▲), 21 (□), 30 (◆) суток.

Токсичность фильтратов, полученных до 10 суток эксперимента включительно, может быть связана с действием серебра. Нетоксичность фильтрата 20-суточной опытной культуры *S. quadricauda* свидетельствует либо об

отсутствии, либо о присутствии к этому времени лишь незначительного количества частиц серебра в культуральной среде, не оказывающего влияния на рост интактной культуры. Появление токсичности у 30-суточного фильтрата можно объяснить, с одной стороны, выделением в среду части накопленного клетками серебра, а с другой - присутствием в этом фильтрате метаболитов водорослей, которые также могли оказать негативное действие на рост интактной культуры.

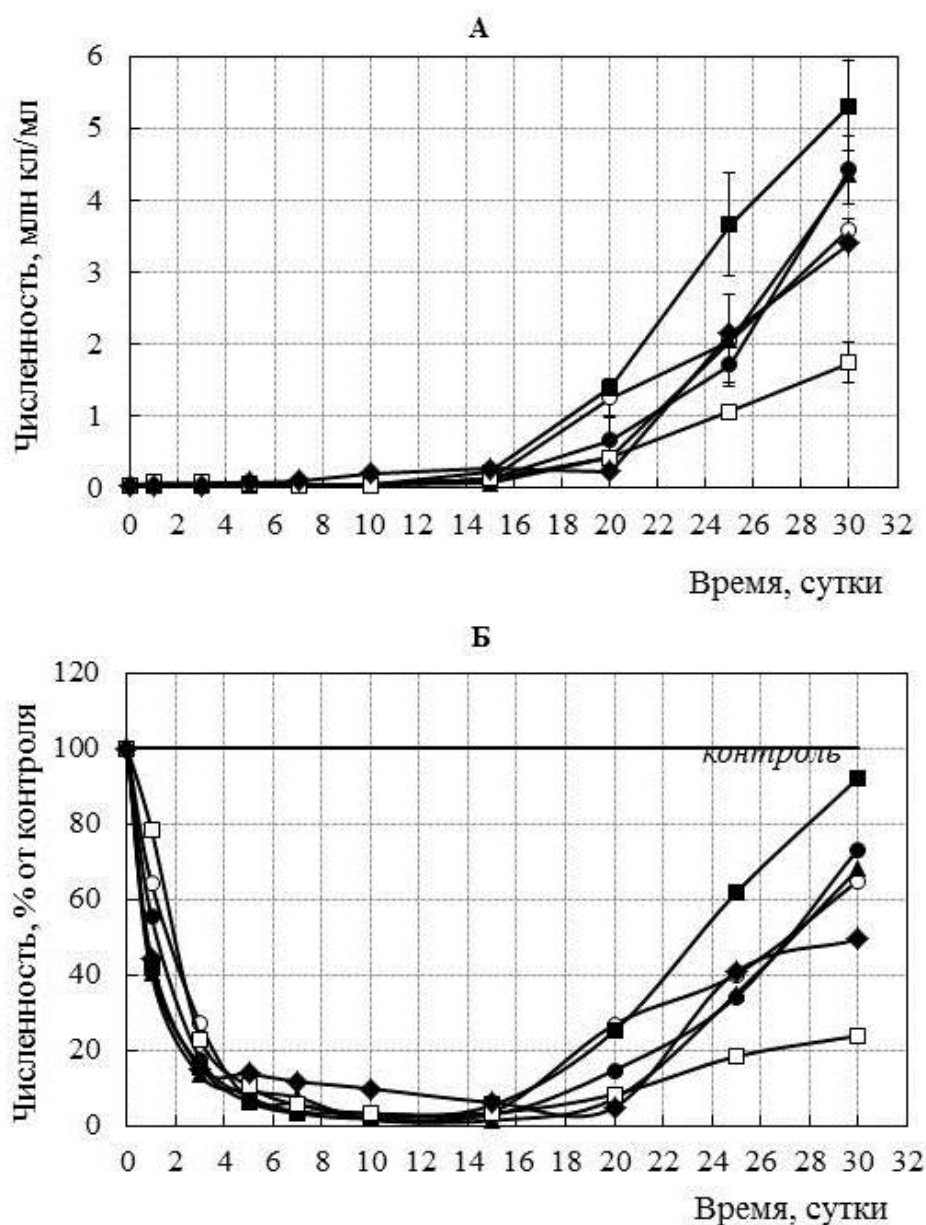


Рисунок 31. Общая (А) и относительная (Б) численность клеток *Scenedesmus quadricauda* при развитии в чистой среде после интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2 (○), 5 (■), 7 (●), 10 (▲), 21 (□) и 30 (◆) суток

После пересева в чистую среду клеток *S. quadricauda*, разное время контактировавших с коллоидным серебром, во всех случаях наблюдалась длительная лаг-фаза (до 15 суток), после которой происходило постепенное увеличение численности (Рисунок 31А). Рост клеток опытной культуры в чистой среде практически не зависел от времени контакта с коллоидным серебром. Однако численность клеток, пересеянных до 10 суток эксперимента включительно, к 30 суткам была ближе к контрольной, чем численность клеток, пересеянных позже, причем хуже всего в чистой среде развивались клетки после 21-суточной интоксикации (Рисунок 31Б).

Таким образом, численность интактных клеток *S. quadricauda* в фильтратах опытных культур, также как и численность контактировавших с серебром клеток в чистой среде, со временем становились близкими к уровню контроля. Полученные данные свидетельствуют о снижении токсичности культуральной среды в процессе развития *S. quadricauda* при добавлении 0.1 мг/л коллоидного серебра. Поскольку наиболее токсичными были фильтраты опытной культуры, полученные до 10 суток включительно, а развитие опытных клеток в чистой среде практически не зависело от времени интоксикации только до 10 суток, можно предположить, что накопление значительного количества серебра водорослями происходит в начальный период (до 10 сут) эксперимента. Токсичность бесклеточных фильтратов для интактной культуры, по-видимому, связана с воздействием на нее остаточных количеств коллоидного серебра в среде после накопления основной его доли клетками при первичной интоксикации. Кроме того, по мере восстановления численности клеток *S. quadricauda* после длительной лаг-фазы в ответ на добавление коллоидного серебра, в ней накапливаются экзометаболиты, которые также могли негативно влиять на рост интактной культуры. Вероятно поэтому 30 суточный фильтрат оказывал слабое ингибирующее действие.

Обобщая данные, полученные в результате исследования фильтратов, можно заключить, что присутствию 0.1 мг/л коллоидного серебра по мере роста обеих культур и накопления клетками серебра, токсичность среды снижалась. Токсичность фильтратов, полученных на ранних сроках интоксикации (до 7 суток) *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в присутствии 0.1 мг/л коллоидного серебра, была практически одинаковой у обеих культур, но численность клеток *M. arcuatum* в чистой среде восстанавливалась быстрее, чем у *S. quadricauda*. Так, длительность лаг-фазы после пересева в чистую среду *M. arcuatum* составила 3-7 суток, а у *S. quadricauda* – 10-15 суток, что указывает на физиологические различия обеих культур. Фильтраты, полученные позже 7 суток, у *M. arcuatum* были более токсичны, чем фильтраты *S. quadricauda*. Некоторые авторы (Gubbins et al., 2011) полагают, что концентрация свободного серебра (Ag^+) в растворе со временем увеличивается за счет высвобождения ионов Ag^+ из коллоида, что способствует повышению токсичности раствора. Также известно, что клетки водорослей в процессе метаболизма способны к выведению избытка поглощенных веществ в окружающую среду, в результате чего она становится вторично токсичной (Дмитриева и др., 2002).

Остаточное количество коллоидного серебра в среде после накопления его клетками при первичной интоксикации оказывало влияние на рост интактных клеток, сопровождавшийся длительной лаг-фазой. Следует обратить внимание на тот факт, что как внутриклеточные, так и внеклеточные метаболиты, содержат многие функциональные группы, способные присоединять металлы, и в дальнейшем выступают в качестве биомолекул-лигандов. Ионы металлов, в том числе ионы Ag, могут связываться с различными биомолекулами (липиды, белки, пептиды, аминокислоты, полисахариды и другие соединения) в основном через серу, азот и кислород с образованием макромолекул (Дмитриева и др., 2002). Таким же свойством обладает хлорофилл клеток, относящийся к хелатным соединениям. Связывание серебра различными биомолекулами инактивирует его токсическое действие. Еще в 1938 г. Ф. Либ (Либ, 1938) показал, что в присутствии белок-содержащих жидкостей бактерицидные свойства серебра

резко снижаются почти в 100 раз. Время действие коллоидного серебра ограничено, т.к. в итоге частицы инактивируются, связываясь с органическим веществом. В связи с этой особенностью эксперименты по влиянию раствора наночастиц на водоросли часто носят острый характер и длятся недолго (например, 1 час), чтобы минимизировать комплексобразование с метаболитами водорослей (Pisicapietra et al., 2012a).

5.4. Структура популяций *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при воздействии коллоидного серебра

Изменение структуры популяций обоих видов изучали в опытных культурах с 0.1 мг/л коллоидного серебра и в контроле на 1, 8 и 17 сутки роста во флаконах. О структуре популяции судили по соотношению делящихся, покоящихся и отмерших клеток при помощи метода микрокультур.

Как видно из Рисунок 25, в контрольной популяции *M. arcuatum* покоящиеся клетки преобладали на протяжении всего эксперимента (57-67 %). Максимальное количество делящихся клеток было отмечено в период 1-4 и 8-11 суток (около 40 %).

В присутствии 0.1 мг/л коллоидного серебра в популяции *M. arcuatum* в 1-4 сутки эксперимента преобладали отмирающие клетки (64 %), доля которых впоследствии снижалась и к 17 суткам стала такой же, как в контроле (7-8 %) (Рисунок 32). Несмотря на то, что в период 8-11 суток в популяции было много отмерших клеток (28 %), более 50 % клеток принимали участие в делении, за счет чего происходило дальнейшее увеличение численности. К 17 суткам количество делящихся клеток снизилось до 27 %, доля же покоящихся, наоборот, возросла до 66 %.

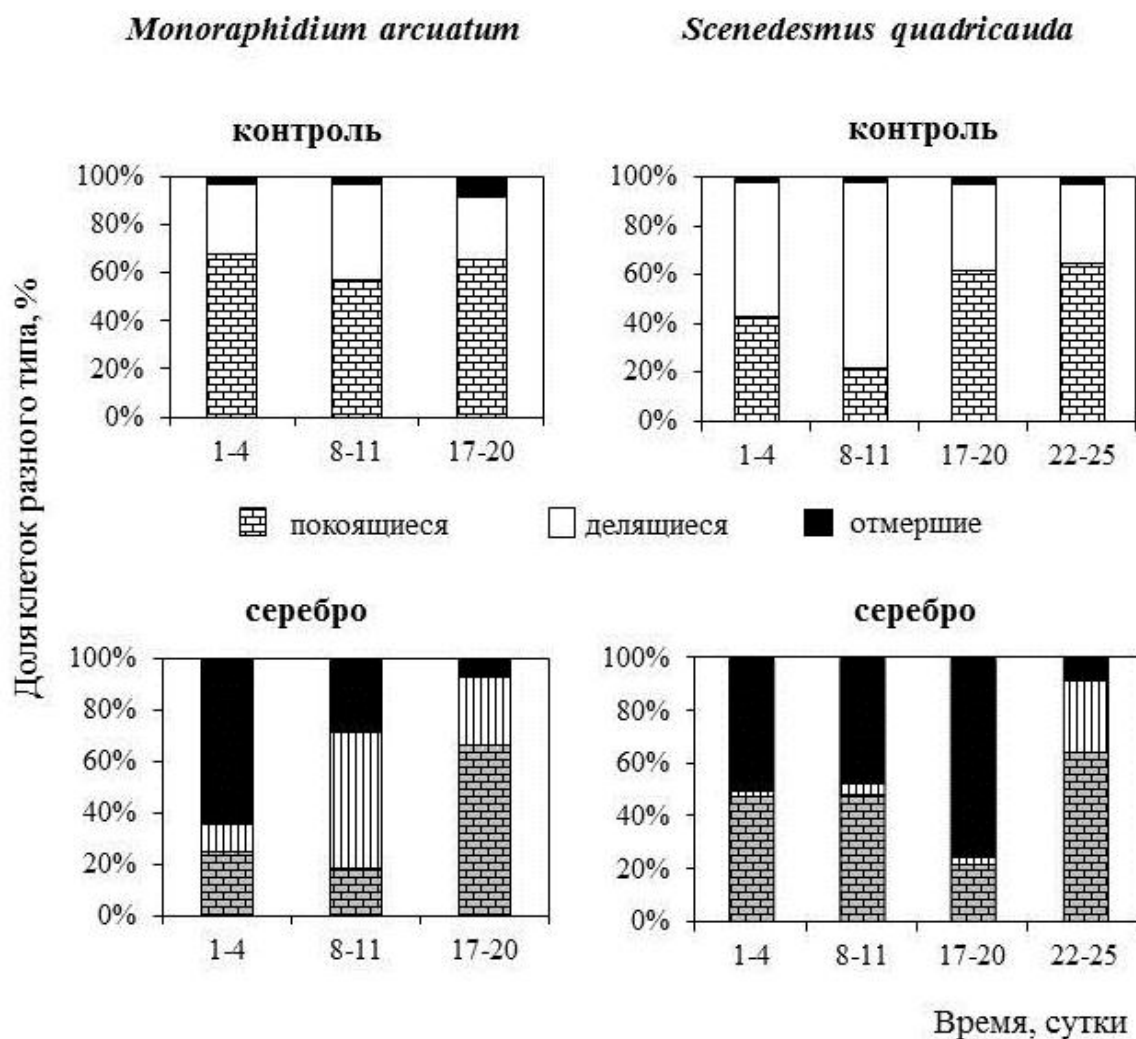


Рисунок 32. Структура популяций *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в контроле и при действии 0.1 мг/л коллоидного серебра

В связи с тем, что у *S. quadricauda* лаг-фаза длилась дольше, чем у *M. arcuatum*, структура популяции была дополнительно исследована на 22 сутки роста (Рисунок 32).

В контрольной популяции *S. quadricauda* на начальных этапах эксперимента преобладали делящиеся клетки (до 77 % на 8-11 сутки), а на более поздних - покоящиеся (до 65 % к 22 суткам). В опытной культуре *S. quadricauda* при воздействии коллоидного серебра доля отмерших клеток была высокой вплоть до 20 суток и составляла 48-76 %, в то время как доля делящихся клеток не превышала 4 %. К 22-25 суткам эксперимента структура популяции изменилась коренным образом: количество отмерших клеток сократилось до 9 %, доля

делящихся клеток увеличилась до 27 %, а преобладающей стала фракция покоящихся клеток (64 %).

Таким образом, интоксикация культур водорослей коллоидным серебром в концентрации 0.1 мг/л на начальных этапах сопровождалась гибелью не менее, чем половины популяции клеток. Далее, в процессе развития культур, структурный состав популяций обоих видов водорослей становится сходным со структурой популяции в контроле. Благодаря восстановлению структуры популяции, в макрокультурах наблюдалось постепенное увеличение численности клеток (см. раздел 5.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе для достижения поставленной цели были решены две основные задачи. Во-первых, получена альгологически чистая культура зеленой хлорококковой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korsh.) Hind., выделенная из фитопланктона р. Москвы, и исследованы особенности ее развития. Во-вторых, определена чувствительность культуры *M. arcuatum* к токсическому воздействию бихромата калия и коллоидного серебра.

Первоначально клетки *M. arcuatum* из накопительной поликультуры были выделены в монокультуру, адаптированную затем к стандартным лабораторным условиям, которые рекомендованы в гостированных документах (ГОСТ Р 54496-2011; Жмур, Орлова, 2007; РД 118-02-90) для выращивания и проведения токсикологических исследований с тест-объектом *S. quadricauda*.

При изучении особенностей развития культуры *M. arcuatum* были использованы следующие показатели: общая численность клеток, соотношение количества живых и мертвых клеток, скорость роста численности, линейные размеры, объем и площадь поверхности клеток, структура популяции, оцениваемая по доле делящихся, покоящихся (не делящихся) и отмерших клеток.

Показано влияние типа емкости для культивирования на рост водорослей, дана оценка конкурентного эффекта *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в смешанной культуре. Для оценки изменения качества среды в процессе развития культуры получали фильтраты контрольных и опытных культур, находящихся на разных стадиях развития. Сделаны микрофотографии клеток в норме и при интоксикации.

Проведенные исследования показали, что культура *M. arcuatum* развивается в соответствии с логистической кривой, причем в цилиндрических флаконах малого объема (10 мл среды) численность клеток в процессе роста культуры выше, чем в колбах, при равной исходной численности клеток. Для культуры *M. arcuatum* характерно преобладание на всех этапах ее развития фракции покоящихся клеток.

Развитие культуры *M. arcuatum* в условиях интоксикации исследовали, используя те же показатели, что и при развитии культуры в норме. Чувствительность *M. arcuatum* к токсическому фактору сопоставляли с чувствительностью признанного в токсикологии тест-объекта - культуры *S. quadricauda*. В результате были получены данные, свидетельствующие о высокой чувствительности *M. arcuatum* к воздействию стандартного токсиканта бихромата калия и фармацевтического препарата коллоидного серебра, сопоставимой с чувствительностью *S. quadricauda*.

Было установлено, что токсичность бихромата калия для культуры *M. arcuatum* прямо пропорциональна его концентрации и практически не зависит от плотности инокулята в диапазоне 50 – 80 тыс. кл/мл. Чувствительность *M. arcuatum* к действию бихромата калия повышается во флаконах, понижается при повторной синхронизации и не зависит от сезона. Бихромат калия замедляет или полностью ингибирует деление клеток, что приводит к изменению структуры популяции.

Исследование влияния коллоидного серебра в диапазоне концентраций от 0.0001 и до 0.1 мг/л позволило выявить большую чувствительность культуры *M. arcuatum* к малым концентрациям (0.0001-0.01 мг/л) по сравнению с культурой *S. quadricauda*. Остротоксичная концентрация (0.1 мг/л) для микроводорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda* вызывает продолжительную лаг-фазу, которая у *M. arcuatum* вдвое короче, чем у *S. quadricauda* и у обеих культур более выражена в колбах, чем во флаконах. В процессе развития культур при интоксикации структурный состав популяций восстанавливается до уровня контроля.

Восстановление численности клеток микроводорослей в чистой среде после интоксикации происходит за счет живых резистентных клеток быстрее у *M. arcuatum*, чем у *S. quadricauda*.

При изучении взаимодействия микроводорослей *M. arcuatum* и *S. quadricauda* в смешанной культуре было установлено, что *M. arcuatum* проявляет низкую конкурентоспособность по отношению к *S. quadricauda* независимо от исходного соотношения численности видов.

Сравнение чувствительности культуры *M. arcuatum* и стандартной тест-культуры *S. quadricauda* к действию бихромата калия и коллоидного серебра свидетельствует о том, что микроводоросль *M. arcuatum* не только не уступает *S. quadricauda*, но и превосходит ее по чувствительности к коллоидному серебру.

В результате проведенных исследований были обнаружены следующие достоинства культуры *M. arcuatum* как потенциального тест-объекта для токсикологических исследований:

- широкая представительность в природных водоемах;
- легкость культивирования и стабильное развитие в лабораторных условиях;
- быстрый рост и высокая численность клеток;
- высокая чувствительность к эталонному токсиканту бихромату калия, сопоставимая с чувствительностью стандартной культуры *S. quadricauda*;
- более высокая чувствительность к токсикантам в цилиндрических флаконах малого объема как предпосылка для использования культуры в полевых условиях;
- хорошая воспроизводимость результатов.

Вышеперечисленные достоинства альгологически чистой культуры *Monoraphidium arcuatum* (Korsh.) Hind. дают основания рекомендовать ее к применению как тест-объект в биотестировании для оценки качества водной среды.

Культура передана на депонирование в коллекцию культур микроводорослей Института Физиологии Растений РАН (М-2017) (Приложение Б).

ВЫВОДЫ

1. Получена альгологически чистая культура хлорококковой микроводоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korsh.) Hind., выделенная из пробы фитопланктона, отобранной в летний период 2008 года из р. Москвы, и исследована как потенциальный тест-объект для биотестирования качества водной среды.
2. Культура *M. arcuatum* развивается в соответствии с логистической кривой и характеризуется короткой лаг-фазой (не более суток), фазой логарифмического роста и стационарной фазой с высокой численностью. Характерным свойством культуры *M. arcuatum* является преобладание покоящихся клеток на всех этапах ее развития. Численность клеток зависит от сезона года и типа емкости для культивирования.
3. В процессе развития культуры *M. arcuatum* увеличивается размерная гетерогенность популяции в основном за счет изменения ширины клеток, значения которой в молодой культуре варьируют от 2.6 до 4.5 мкм, а в более зрелой - от 1.8 до 4.8 мкм. Длина менее вариабельна: в молодой культуре преобладают клетки с длиной 20-22 мкм, а в зрелой - 22-24 мкм. Значение средней площади поверхности, объема клеток, а также их соотношение (удельная поверхность) не зависят от возраста культуры.
4. Показана высокая чувствительность культуры *M. arcuatum* к эталонному токсиканту бихромату калия, сопоставимая с чувствительностью стандартного тест-объекта *S. quadricauda*. Токсичность бихромата калия зависит от его концентрации и типа емкости для культивирования и не зависит от плотности инокулята в диапазоне 50 – 80 тыс. кл/мл. Бихромат калия увеличивает долю покоящихся клеток, что изменяет соотношение клеточных фракций в структуре популяции.
5. Культура *M. arcuatum* проявляет большую чувствительность к действию малых концентраций коллоидного серебра (0.0001-0.01), чем *S. quadricauda*. Остротоксичная концентрация (0.1 мг/л) у обеих культур вызывает продолжительную лаг-фазу, которая у *M. arcuatum* вдвое короче, чем у *S.*

quadricauda, и у обеих культур более выражена в колбах, чем в цилиндрических флаконах. После окончания лаг-фазы, во время которой погибает до 99 % клеток, структура популяций обоих видов водорослей восстанавливается до уровня контроля. Токсичность коллоидного серебра (0.1 мг/л) снижается в начальный период интоксикации (до 10 суток). Клетки *M. arcuatum*, пересеянные после интоксикации в чистую среду, быстрее восстанавливают численность популяции, чем клетки *S. quadricauda*.

6. В смешанной культуре *M. arcuatum* проявляет низкую конкурентоспособность по отношению к *S. quadricauda* независимо от исходного соотношения численности обоих видов, как в норме, так и при действии бихромата калия.

7. Культура *M. arcuatum* соответствует требованиям, предъявляемым к тест-объектам в биотестировании, и поэтому может быть рекомендована для оценки качества водной среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, Ю. В. Тяжелые металлы в агроландшафте. научно-практическое пособие / Ю. В. Алексеев. - СПб.: ПИЯФ РАН, 2008. - 216 с.
1. Альберт, А. Избирательная токсичность: В 2-х т. Т.1 / В. А. Филов (ред.). – М: Медицина, 1989. – 400 с.
2. Андреева, В. М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales) / В.М. Андреева. – СПб: Наука, 1998. - 351 с.
3. Артари, А. К вопросу о влиянии среды на форму и развитие водорослей / А. К. Артари // Известия Московского технического училища. - М., 1903. - С. 1-93.
4. Артюхова, В. И. Влияние бихромата калия на динамику роста культуры и размеры клеток *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. в различные сезоны года / В. И. Артюхова, А. Г. Дмитриева, О. Ф. Филенко, Ч. Ицзюнь // Альгология. – 1996. - Т. 6. - № 1. - С. 26 – 34.
5. Артюхова, В. И. Изменение динамики роста культуры и размеров клеток *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. при действии бихромата калия / В. И. Артюхова, А. Г. Дмитриева, О. Ф. Филенко, Ч. Ицзюнь // Известия АН. – Серия: Биологическая. – 1997. - №3. – С. 80-86.
6. Артюхова, В. И. Функциональные изменения, происходящие в лабораторной популяции микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. при различных режимах токсического воздействия / В. И. Артюхова, А. Г. Дмитриева, О. Ф. Филенко, Ч. Ицзюнь // Вестник московского ун-та. - Серия: 16, Биология. - 2000. - № 2. - С. 52-59.
7. Бернавски, З. Коллоидное серебро / З. Бернавски. – М.: Корал Клаб, 2006. – 24 с.
8. Бигалиев, А. В. Цитогенетическое исследование in vivo мутагенных свойств соединений хрома / А. Б. Бигалиев, М. Н. Туребаев, М. Ш. Елемесова // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. – М: Наука, 1977. - С. 173-176.

9. Божков, А. И. Динамика роста, липидный состав и содержание β -каротина в клетках *Dunaliella viridis* Teod. при культивировании в разных типах фотобиореакторов / А. И. Божков, Н. Г. Мензянова // Альгология. - 1997. - Т.7. - №1. - С. 78-86.
10. Бойчук, Т. В. Закономерности влияния серебра на микроводоросли (на примере лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda*): дисс. ... канд. биол. наук.: 03.00.18 / Бойчук Татьяна Викторовна. - М.: 2007. - 134 с.
11. Брагинский, Л. П. Методика токсикологического эксперимента на синезеленых водорослях / Л. П. Брагинский, Л. А. Сиренко // Методики биологических исследований по водной токсикологии. – М.: Наука, 1971. – С. 191-205.
12. Брагинский, Л. П. Пресноводный планктон в токсической среде / Л. П. Брагинский, И. М. Величко, Э. П. Щербань. - Киев: Наукова Думка, 1987. - 180 с.
13. Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей: ГОСТ Р 54496-2011.
14. Гапочка Л. Д. Об адаптации водорослей к токсическому воздействию / Л. Д. Гапочка. - М.: МГУ, 1981. - 80 с.
15. Гапочка, М. Г. Экологические аспекты взаимодействия электромагнитных полей миллиметрового диапазона с биологическими объектами: дисс. ... д-ра биол. наук: 03.02.08 / Гапочка Михаил Германович. – М.: 2013. - 214 с.
16. Грушко, Я. М. Ядовитые металлы и их неорганические соединения в промышленных сточных водах / Я. М. Грушко – М.: Медицина, 1972. – 175 с.
17. Дмитриева, А. Г. Анализ функциональных показателей популяции водорослей в условиях накопления меди / А. Г. Дмитриева, Г. А. Даллакян, Н. Л. Лысенко // Альгология. – 1992. – Т. 2. - №2. – С. 30-36.
18. Дмитриева, А. Г. Метод биотестирования по определению живых и мертвых клеток водорослей с помощью люминесцентной микроскопии / А. Г. Дмитриева // Методы биотестирования вод. – Черноголовка, 1998. - С. 85-89.
19. Дмитриева, А. Г. Физиология растительных организмов и роль металлов / А. Г. Дмитриева, О. Н. Кожанова, Н. Л. Дронина. - М: МГУ, 2002. - 160 с.

20. Дмитриева, А. Г. Функциональная гетерогенность популяции клеток микроводоросли *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew. (Chlorophyta) в норме и при интоксикации / А. Г. Дмитриева, О. Ф. Филенко, В. И. Ипатова // Альгология (Киев). — 2014. — № 2. — С. 147–162.
21. Ждан-Пушкина С. М., Хасанова Л. А. Некоторые аспекты роста культур микроорганизмов / Уфа, 1991. 126 с.
22. Зарубина, А. П. Биотестирование тест-системой «Эколюм» токсичности бытовых стоков после облучения электромагнитным полем / А. П. Зарубина, М. Г. Гапочка, Л. А. Новоселова, Л. Д. Гапочка // Вестн. Моск. Ун-та. – Серия: 16 Биология. – 2012. - №3. – С. 39-43.
23. Ильяш, Л. В. Жизненные стратегии у морских планктонных микроводорослей: автореф. дисс. ... док. биол. наук: 03.00.18 / Ильяш Людмила Васильевна. – М.: 1998. - 48 с.
24. Ипатова, В. И. Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды / В. И. Ипатова. – М.: «Графикон-принт», 2005. – 224 с.
25. Ипатова, В. И. Влияние начальной плотности популяции на проявление токсичности веществ в испытаниях с использованием микроводорослей / В. И. Ипатова, В. Ю. Прохоцкая, Е. Е. Коломенская // Токсикологический вестник. – 2011. - №2 (107). - С. 51-55.
26. Ипатова, В. И. Адаптация водных растительных организмов к химическому загрязнению окружающей среды / В. И. Ипатова // Экологические системы и приборы. - 2013. - № 3. - С. 47–53.
27. Крайнюкова, А. Н. Система интегральной токсикологической оценки природных и сточных вод / А. Н. Крайнюкова // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. - 2009. – Т. 1. - № 4 (37). - С. 30-33.
28. Крутяков, Ю. А. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, А. Ю. Оленин, Г. В. Лисичкин // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. - № 3.– С. 242-269.
29. Куриленко, О. Д. Краткий справочник по химии / О. Д. Куриленко. – К.: Наукова Думка, 1974 – 991 с.

30. Ладыгина, Л. В. Интенсивность роста и биохимический состав микроводоросли *Dunaliella viridis* Teod. в зависимости от условий культивирования / Л. В. Ладыгина // Экология моря. – 2005. - № 6. - С. 56-60.
31. Либ, Ф. Изучение бактерицидных свойств серебра / Ф. Либ // Советская стоматология. - 1938. - Т. 4. - № 31. - С. 36-40.
32. Лозина-Лозинский Л. К. О реакции биологических систем на экстремальные воздействия в связи с задачами экзобиологии / Сб. Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. - М. – Л.: Наука, 1966. – С. 3-10.
33. Макарова, Е. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем / Е. И. Макарова, И. П. Отурина, А. И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 20. – С. 120-133.
34. Марушкина Е. В. Исследование состояния популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* в норме и при интоксикации методом микрокультур: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.18 / Марушкина Екатерина Викторовна. - М.: 2005. - 129 с.
35. Жмур, Н. С. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей / Н. С. Жмур, Т. Л. Орлова. - М.: АКВАРОС, 2007. - 48 с.
36. Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов ПДК веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения / С. А. Соколова (Ред.). - М.: ВНИРО, 2011. - 201 с.
37. Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды и водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение / О. Ф. Филенко и С. А. Соколова (Ред.) - М.: ВНИРО, 1998. - 145 с.
38. Методическое руководство по биотестированию воды: РД 118-02-90. - М., 1991. - 48 с.
39. Мур, Дж. В. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния / Мур, Дж. В., С. Рамамурти С. - М.: Мир, 1987. - 288 с.

40. Никонова, С. Е. Удельная поверхность культур одноклеточных водорослей, как характеристика их функциональной активности / С. Е. Никонова // Эколого-физиологические исследования водорослей и их значение для оценки состояния природных вод. – Ярославль: РАН, 1996. – С. 158-159.
41. Новикова, И. П. Изменение функционального состояния клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. в присутствии бихромата калия в среде / И. П. Новикова, Т. В. Паршикова, В. В. Власенко, И. Б. Зубенко // Альгология. — 2008. — Т. 18. - № 2. — С. 113-122.
42. Патин, С. А. Эколого-токсикологические аспекты изучения и контроля качества водной среды / С. А. Патин // Гидробиол. журнал. – 1991. - Т. 27. - №3. – С. 75-77.
43. Патин, С. А. Нефть и экология континентального шельфа / С. А. Патин. - М: ВНИРО, 2001. – 247 с.
44. Прохоцкая, В. Ю. Структурно-функциональные характеристики модельной популяции *Scenedesmus quadricauda* при интоксикации: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.18 / Прохоцкая Валерия Юрьевна. - М.: 2000. – 135 с.
45. Сиренко, Л. А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко, А. И. Сакевич, Л. Ф. Осипов, Л. Ф. Лукина, М. И. Кузьменко, В. Н. Козицкая, И. М. Величко, В. О. Мыслович, М. Я. Гавриленко, В. В. Арендарчук, Ю. А. Кирпенко / А. В. Топачевский (ред.) - Киев: Наукова Думка, 1975. – 247 с.
46. Строганов, Н. С. Методика определения токсичности водной среды / Н. С. Строганов. - Методики биологических исследований по водной токсикологии. - М.: Наука, 1971. - С. 14-61.
47. Таранов, Л. И. Серебряная вода. Метод Таранова / Л. И. Таранов, И. А. Филиппова. – М.: Диля, 2007. – 160 с.
48. Ташлыкова, Н. А. Экологические особенности развития фитопланктона дельтовых протоков реки Селенги и сора Черкалово (оз. Байкал): дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.18 / Ташлыкова Наталия Александровна. - Улан-Удэ: 2009. - 151 с.

49. Успенская В. И. Экология и физиология питания пресноводных водорослей / В. И. Успенская. - М.: МГУ, 1966. - 124 с.
50. Филенко О.Ф. Водная токсикология / О. Ф. Филенко // А. С. Константинов, С. А. Патин (ред.). – М.: МГУ, 1988. - 154 с.
51. Филенко, О. Ф. Исследование структуры модельной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* методом раздельного культивирования клеток / О. Ф. Филенко, А. Г. Дмитриева, Е. В. Марушкина // Материалы Международной научно-практической конференции МГУ-СУНИ «Человечество и окружающая среда». – Москва, 2004. - С. 190-193.
52. Филенко, О.Ф. Исследование лабораторной популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Brèb. методом микрокультур / О. Ф. Филенко, А. Г. Дмитриева, Е. В. Марушкина // Гидробиол. журн. — 2007а. — Т. 42. - № 5. — С. 80—88.
53. Филенко, О. Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды / О. Ф. Филенко // Экологические системы и приборы. - 2007б - №6. – С. 18-20.
54. Хайлов, К. М. Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / К. М. Хайлов (ред.). – К.: Наукова Думка, 1971. - 206 с.
55. Хайлов К. М. Связь содержания хлорофилла, интенсивности фотосинтеза и роста с величиной удельной поверхности морских многоклеточных водорослей / К. М. Хайлов, С. А. Кавардаков, Г. Г. Миничева, В. Л. Шмелева // Физиол. раст. – 1991. – Т. 38. - № 2. – С. 346-351.
56. Царенко, П. М. Краткий определитель Хлорококковых водорослей Украинской ССР / П. М. Царенко. – Киев: Наукова Думка, 1990. - 198 с.
57. Ицзюнь, Ч. Влияние изменяющихся токсических нагрузок на структурно – функциональные характеристики водоросли *Scenedesmus quadricauda* в культуре: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.18 / Чжао Ицзюнь - М.: 1994. - 125 с.
58. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. - 567 с.

59. A database of silver nanotechnology in commercial products [Electronic Resource]. – Washington: Project of emerging nanotechnologies, 2016. – <http://www.nanotechproject.org/inventories/silver/>.
60. Algae and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test” / OECD Guidelines for the testing of chemicals Freshwater. - Paris, 2006. - 25 p.
61. Bassi, M. Effects of chromium (VI) on two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*. 1. Morphological observations / M. Bassi, M. G. Corradi, M. Realine // Cytobios. – 1990. – V. 62. - № 248. – P. 27-38.
62. Bengtson Nash, S. M. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay / S. M. Bengtson Nash, P. A. Quayle, U. Schreiber, J. F. Müller // Aquat. Toxicol. - 2005. – V. 72. - № 4. – P. 315-326.
63. Blaise, C. Algal microplate toxicity test / C. Blaise, P. Vasseur - Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations / C. Blaise, J. F. Ferard (Ed.). - V. 1. - The Netherlands: Springer, 2005. – P. 137–179.
64. Boyle, T. P. The effect of environmental contaminants on aquatic algae / T. P. Boyle - Algae as ecological indicators / L. E. Shubert (Ed.). - London: Academic press, 1984. – P. 237-256.
65. Blaser, S. A. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles / S. A. Blaser, M. Scheringer, M. MacLeod, K. Hungerbühler // Sci. Total Environ. - 2008. – V. 390. - № 2-3. – P. 396–409.
66. Borowitzka, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters / M. A. Borowitzka // J. Biotechnol. – 1999. – V. 70. - № 1-3. – P. 313-321.
67. Bulich, A. A. The luminescent bacteria toxicity test: its potential as *in vitro* alternative / A. A. Bulich, K.-K. Tung, G. Scheibner // J. Biolumin. Chemilumin.-1990. - V. 5. – № 2. – P. 71-77.
68. Brady, D. Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* algae / D. Brady, B. Letebele, J. R. Duncan, P. D. Rose // Water SA. – 1994. – V. 20. – № 3. – P. 213-218.

69. Cervantes, C. Interactions of chromium with microorganisms and plants / C. Cervantes, J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzmán, R. Moreno-Sánchez // FEMS Microbiol. Rev. - 2001. – V. 25. - № 3. – P. 335-347.
70. Chandra, P., Kulshreshtha K. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants / P. Chandra, K. Kulshreshtha // Bot. Rev. – 2004. – V. 70. - № 3. – P. 313-327.
71. Chinnapongse, S. L. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters / Chinnapongse S. L., MacCuspie R. I., Hackley V. A. // Sci. Total Environ. – 2011. – V. 409. - № 12. – P. 2443–2450.
72. Croxton, A. N. The use of flow cytometric applications to measure the effects of PAHs on growth, membrane integrity, and relative lipid content of the benthic diatom, *Nitzschia brevirostris* / A. N. Croxton, G. N. Wikfors, R. D. Schulerbrandt-Gragg // Mar. Pollut. Bull. – 2015. – V. 91. - № 1. - P. 160–165.
73. Cullimore, D. M. A qualitative method of assessing the available nitrogen, potassium and phosphorus in the soil / D. M. Cullimore // J. Sci. Food Agric. - 1966. – V. 17. - № 7 – P. 321-323.
74. Cumberland, S. A. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions / S. A. Cumberland, J. R. Lead // J. Chromatogr. A. - 2009. – V. 1216. - № 52. – P. 9099-9105.
75. Dash, A. Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae / A. Dash, A. P. Singh, B. R. Chaudhary, S. K. Singh, D. Dash // Nano-Micro Lett. - 2012. – V. 4. – № 3. – P. 158-165.
76. De Lima, R. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles / R. De Lima, A. B. Seabra, N. Durán // J. Appl. Toxicol. - 2012. - V. 32. - № 11. - P. 867-879.
77. Di Toppi L.S., Pawlik-Skowronska B., Vurro E., Vattuone Z., Kalinowska R., Restivo F.M., Musetti R., Skowronski T. First and second line mechanisms of cadmium

- detoxification in the lichen photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta) // Environ. Pollut. - 2008. - V. 151. - №2. - P. 280–286.
78. Egan, P. F. Low cell density: the unifying principle for unicell development in *Scenedesmus* (Chlorophyta) / P. F. Egan, F. R. Trainor // Brit. Phycol. J. - 1989. – V. 24. - № 3 - P. 271 – 283.
79. Fortin, C. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: influence of chloride / C. Fortin, P. G. C. Campbell // Environ. Toxicol. Chem. - 2000. - V. 19. - № 11. - P. 2769–2778.
80. Franklin, N. M. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry / N. M. Franklin, M. S. Adams, J. L. Stauber // Arch. Environ. Contam. Toxicol. - 2001. – V. 40. - № 4. – P. 469-480.
81. Franklin, N. M. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays / N. M. Franklin, J. L. Stauber, S. C. Apte, R. P. Lim // Environ. Toxicol. Chem. - 2002. – V. 21. - № 4. – P. 742–751.
82. Franqueira, D. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae / D. Franqueira, M. Orosa, E. Torres, C. Herrero, A. Cid // Sci. Total. Environ. - 2000. – V. 247. - № 2-3. – P. 119-126.
83. Friebele, E. S. Relationship between phytoplankton cell size and the rate of orthophosphate uptake: in situ observations of an estuarine population / E. S. Friebele, D.L. Correll, M.A. Faust // Marine Biol. – 1978. - V. 45. – P. 39-52.
84. Geis, S. W. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay / S. W. Geis, K. L. Fleming, E. T. Korthals, G. Searle, L. Reynolds, D. A. Karner // Environ. Toxicol. Chem. - 2000. - V. 19. - № 1. – P. 36–41.
85. Geranio, L. The behavior of silver nanotextiles during washing / L. Geranio, M. Heuberger, B. Nowack // Environ. Sci. Technol. - 2009. – V. 43. - № 21. – P. 8113–8118.
86. Gottschalk, F. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions / F. Gottschalk, T. Sonderer, R. W. Scholz, B. Nowack // Environ. Sci. Technol. - 2009. – V. 43. - № 24. – P. 9216-9222.

87. Gross, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs / E. M. Gross // Crit. Rev. Plant. Sci. – 2003. - V. 22. - № 3-4. – P. 313–339.
88. Gubbins, E. J. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. / E. J. Gubbins, L. C. Batty, J. R. Lead // Environ. Pollut. - 2011. – V. 159. - №6. – P. 1551-1559.
89. Handy, R. D. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs / R. D. Handy, R. Owen, E. Valsami-Jones // Ecotoxicology. – 2008. – V. 17. - № 5. – P. 315-325.
90. Hillebrand, H. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae / H. Hillebrand, C.-D. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollinger, T. Zohary // J. Phycol. - 1999. - № 35. – P. 403–424.
91. Hsieh, S. H. The combined toxic effects of nonpolar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata* / S. H. Hsieh, K. P. Tsai, C. Y. Chen // Water Res. - 2006. – V. 40. - № 10. – P. 1957–1964.
92. Hoffmann, A. A. Evolutionary Genetics and Environmental Stress / A. A., Hoffmann, P. A. Parsons - Oxford: Oxford University Press, 1993. - 284 p.
93. Hu, X. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles / X. Hu, S. Cook, P. Wang, H. M. Hwang // Sci. Total Environ. - 2009. – V. 407. - № 8. - P. 3070–3072.
94. Jia, X. H. Allelopathic inhibition by *Scenedesmus obliquus* of photosynthesis and growth of *Microcystis aeruginosa* / X. H. Jia, D. J. Shi, R. J. Kang, H. M. Li, Y. Liu Y et al. // Photosynthesis. Energy from the Sun. – 2008. – P. 1339-1342.
95. Jop, K. M. Comparative toxicity and speciation of two hexavalent chromium salts in acute toxicity tests / K. M. Jop, T. F. Parkerton, J. H. Rodgers Jr., K. L. Dickson, P. B. Dom // Environ. Toxicol. Chem. - 1987. - V. 6. - №9. - P. 697-703.
96. Klaine, S. J. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects / S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead // Environ. Toxicol. Chem. - 2008. – V. 27. - № 9. - P. 1825–1851.

97. Krienitz, L. SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay algae “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta / L. Krienitz, C. Bock, H. Nozaki, M. Wolf // J. Phycol. - 2011. – V. 47. - № 4. – P. 880–893.
98. Labra, M. The combined toxic and genotoxic effects of chromium and volatile organic contaminants to *Pseudokirchneriella subcapitata* / M. Labra, F. De Mattia, M. Bernasconi, D. Bertacchi, F. Grassi, I. Bruni, S. Citterio // Water, Air, Soil Pollut. - 2010. – V. 213. - № 1. - P. 57-70.
99. Lee, D. Y. Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii* / D. Y. Lee, C. Fortin, P.G.C. Campbell // Aquat. Toxicol. - 2005. – V. 75. - №2. – P. 127–135.
100. Lewis, M. A. Algae and vascular plant tests / M. A. Lewis. - Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment / G. M. Rand (Ed.). – Washington: Taylor & Francis, 1995. – P. 135-169.
101. Lüring, M. Importance of nutrient competition and allelopathic effects in suppression of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the macrophytes *Chara*, *Elodea* and *Myriophyllum* / M. Lüring, G. van Geest, M. Scheffer // Hydrobiologia. – 2006. – V. 556. - № 1. – P. 209–220.
102. Lopez-Rodas, V. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations / V. Lopez-Rodas, M. Agrelo, E. Carrillo, L. M. Ferrero, A. Larrauri, L. Martin-Otero, E. Costas // Eur. J. Phycol. - 2001.- V. 36. - № 2. - P. 179–190.
103. Machado, M. D. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress / M. D. Machado, E. V. Soares // Aquat. Toxicol. - 2014. – V. 147. – P. 1– 6.
104. Mehta, S. K. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects / S. K. Mehta, J. P. Gaur // Crit. Rev. Biotechnol. - 2005. – V. 25. - № 3. – P. 113-152.

105. Menz, J. Toxicity testing with luminescent bacteria – Characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects / J. Menz, M. Schneider, K. Kümmerer // *Chemosphere*. - 2013. – V. 93. - № 6. - P. 990-996.
106. Miao, A. J. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances / A. J. Miao, K. A. Schwehr, C. Xu, S. J. Zhang, Z. P. Luo, A. Quigg, P. H. Santschi // *Environ. Pollut.* - 2009. – V. 157. - № 11. - P. 3034–3041.
107. Miao, A.-J. Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica* / A.-J. Miao, Z. P. Luo, C. S. Chen, W. C. Chin, P. H. Santschi, A. Quigg // *PLoS ONE*. - 2010. - V. 5. - № 12. – P. e15196.
108. Moore, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? / M. N. Moore // *Environ. Int.* - 2006. - № 32(8). - P. 967–976.
109. Mueller, N. C. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment / N. C. Mueller, B. Nowack // *Environ. Sci. Technol.* - 2008. - № 42. – P. 4447–4453.
110. Nakamura, H. Biological knowledges on species of *Chlorella* and *Scenedesmus* / H. Nakamura. - Tokyo: Kyoritsu Women's University, 1963. - 43 p.
111. Navarro, E. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* / E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak // *Environ. Sci. Technol.* - 2008a. - V. 42. - № 23. - P. 8959–8964.
112. Navarro, E. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi / E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A. J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi, L. Sigg // *Ecotoxicology*. - 2008b. – V. 17. - № 5. - P. 372–386.
113. Nygaard, G. Taxonomic designations of the bioassay alga NIVA-CHL 1 («*Selenastrum capricornutum*») / G. Nygaard, J. Komárek, J. Kristiansen, O. M. Skulberg // *Opera Bot.* – 1986. - № 90. – P. 1–46.

114. Nyholm, N. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae / N. Nyholm, T. Källqvist // *Environ. Toxicol. Chem.* - 1989. – V. 8. - № 8. – P. 689–703.
115. Okamoto, O. K. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts / O. K. Okamoto, E. Pinto, L. R. Latorre, E. J. H. Bechara, P. Colepicolo // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 2001. – V. 40. - № 1. – P. 18–24.
116. Oukarroum, A. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* / A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2012. – V. 78. - P. 80–85.
117. Oukarroum, A. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba* / A. Oukarroum, L. Barhoumi, L. Pirastru, D. Dewez // *Environ. Toxicol. Chem.* - 2013. – V. 32. - № 4. - P. 902–907.
118. Pacheco, A. Microplates as a microreactor platform for microalgae research / A. Pacheco, I. Hernández-Mireles, C. García-Martínez, M. M. Álvarez // *Biotechnol. Progr.* - 2013. – V. 29. - № 3. – P. 638-644.
119. Pfeiffer, W.C. Fate of chromium in a tributary of the Irajá river, Rio de Janeiro / W. C. Pfeiffer, M. Fiszman, N. Carbonell // *Environ. Pollut.: Series B Chemical and Physical.* -1980. – V. 1. - № 2. – P. 117–126.
120. Piccapietra, F. Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate / F. Piccapietra, C. G. Allué, L. Sigg, R. Behra // *Environ. Sci. Technol.* - 2012a. – V. 46. - №. 13. - P. 7390–7397.
121. Piccapietra, F. Colloidal stability of carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater / F. Piccapietra, L. Sigg, R. Behra // *Environ. Sci. Technol.* -2012b. – V. 46. - № 2. - P. 818–825.
122. Pinto, E. Heavy metal-induced oxidative stress in algae / E. Pinto, T. C. S. Sigaud-Kutner, M. A. S. Leitão, O. K. Okamoto, D. Morse, P. Colepicolo // *J. Phycol.* - 2003. – V. 39. - № 6. – P. 1008–1018.

123. de Queiroz, J. C. The growth of *Monoraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp. cells in the presence of Thorium / J. C. de Queiroz, A.C. de Melo, A. C. A. da Costa // Sci. World J. – 2012. - V. 2012. - ID 592721. - 8 p.
124. Radakovits, R. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production / R. Radakovits, R. E. Jinkerson, A. Darzins, M. C. Posewitz // Eukaryotic cell J. - 2010. – V. 9. - № 4. - P. 486–501.
125. Ratte, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review / H. T. Ratte // Environ. Sci. Technol. - 1999. - V. 18. - № 1. - P. 89-108.
126. Rai, M. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // Biotechnol. Adv. - 2009. - V. 27. - № 1.- P. 76–83.
127. Rodríguez, M. C. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii* / M. C. Rodríguez, L. Barsanti, V. Passarelli, V. Evangelista, V. Conforti, P. Gualtieri // Environ. Res. - 2007. – V. 105. - № 2. – P. 234–239.
128. Schafer, H. Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants / H. Schafer, H. Hettler, U. Fritsche, G. Pitzen, G. Rodeger, A. Wenzel // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 1994. – V. 27. - № 1. P. 64 – 81.
129. Shi, X. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species / X. Shi, N. S. Dalal // Arch. Biochem. Biophys. - 1990. – V. 277. - № 2. - P. 342-350.
130. Smith, R. E. H. The effect of phosphorus limitation on algal growth Rates: Evidence from Alkaline Phosphatase / R. E. H. Smith, J. Kalff // Can. J. Fisher. Aquat. Scien. – 1981. - 38(11). – P. 1421-1427.
131. Soni, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria / I. Soni, B. Salopek-Soni // J. Colloid Interface Sci. - 2004. – V. 275. - № 1. - P. 177-182.
132. St-Laurent, D. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures / D. St-Laurent, C. Blaise, P. Macquarrie, R. Scroggins, B. Trottie // Environ. Toxicol. Water Qual. - 1992. – V. 7. - № 1. – P. 35–48.

133. Szivák, I. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) / I. Szivák, R. Behra, L. Sigg // J. Phycol. - 2009. – V. 45. - № 2. – P. 427–435.
134. Takami, R. The interplay between thiol-compounds against chromium (VI) in the freshwater green alga *Monoraphidium convolutum*: toxicology, photosynthesis, and oxidative stress at a glance / Takami, R., J. V. Almeida, C. V. Vardaris, P. Colepicolo, M. P. Barros // Aquat. Toxicol. – 2012. – V. 118-119. - P. 80–87.
135. Tamiya, H. Synchronous cultures of algae / H. Tamiya // Annu. Rev. Plant Physiol. -1966. - V. 17. - P. 1-26.
136. Tang, D. The distribution of biogenic thiols in surface waters of Galveston Bay / D. Tang, C.-C. Hung, K. W. Warnken, P. H. Santschi // Limnol. Oceanogr. – 2000. - V. 45. - № 6. –P. 1289–1297.
137. Tchan, Y. T. Study of soil algae. III. Bioassay of soil fertility by algae / Y. T. Tchan // Plant and Soil. – 1959. - V. 10. - № 3. - P. 220-232.
138. Trainor, F. R. Indicator algal assay: laboratory and field approaches / F. R. Trainor - Algae as ecological indicators / L. E. Shubert (Ed.). - London: Academic press, 1984. – P. 3-14.
139. Trainor, F. R. Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): an ordered sequence of ecomorph development / F. R. Trainor // J. Phycol. – 1992. – V. 28. - № 4. - P. 553 – 556.
140. Vajpayee, P. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. / P. Vajpayee, R. D. Tripathi, U. N. Rai, M. B. Ali, S. N. Singh // Chemosphere. – 2000. - V. 41. - № 7. - 1075-1082.
141. Volland, S. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias* / S. Volland, C. Lütz, B. Michalke, U. Lütz-Meindl // Aquat. Toxicol. - 2012. – V. 109. - P. 59–69.
142. Völker, C. Comparative toxicity assessment of nanosilver on three daphnia species in acute, chronic and multi-generation experiments / C. Völker, C. Boedicker, J.

- Daubenthaler, M. Oetken, J. Oehlmann // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. - № 10. – P. e75026.
143. Wakatsuki, T. Metal oxidoreduction by microbial cells / T. Wakatsuki // J. Ind. Microbiol. - 1995. - № 14. - P. 169-177.
144. Wang, W. Chromate ion as a reference toxicant for aquatic phytotoxicity tests / W. Wang // Environ. Toxicol. and Chem. – 1987. – V. 6. - №12. - P. 953-960.
145. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*: ISO-8692. - Geneva, 1989.
146. Wed, Y. Allometric scaling of compartmental fluxes of phosphorus in freshwater algae / Y. H. Wed, A. Vesina A., R. H. Peters // Limnol. Oceanogr. – 1997. – V. 42. - № 1. – P. 45-56.
147. Wise, S. S. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms / S. S. Wise, A. L. Holmes, J. P. Wise Sr. // Rev. Environ. Health. – 2008. – V. 23. - № 1. – P. 39–57.
148. Wise Sr, J. P. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells / J. P. Wise Sr, B. C. Goodale, S. S. Wise, G. A. Craig, A. F. Pongan, R. B. Walter, D. Thompson, A. K. Ng, A. M. Aboueissa, H. Mitani, M. J. Spalding, M. D. Mason // Aquat. Toxicol. - 2010. - V. 97. - № 1. - P. 34–41.
149. Wilber, W.G. Aquatic transport of heavy metals in the urban environment / W. G. Wilber, J. V. Hunter // JAWRA. - 1977. – V. 13. - № 4. – P. 721-734.
150. Work, V. H. Improving photosynthesis and metabolic networks for the competitive production of phototroph-derived biofuels / V. H. Work, S. D'Adamo, R. Radakovits, R. E. Jinkerson, M. C. Posewitz // Biotechnology. – 2012. – V. 23. - № 3. – P. 290–297.
151. Yentsch, C. M Automated individual cell analysis in aquatic research / C. M. Yentsch, S. A. Pomponi // Int. Rev. Cytol. – 1986. - № 105. - P. 183-243.
152. Yu, Y. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry / Y. Yu, F. Kong, M. Wang, L. Qian, X. Shi // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2007. - V. 66. - №1. - P. 49–56.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

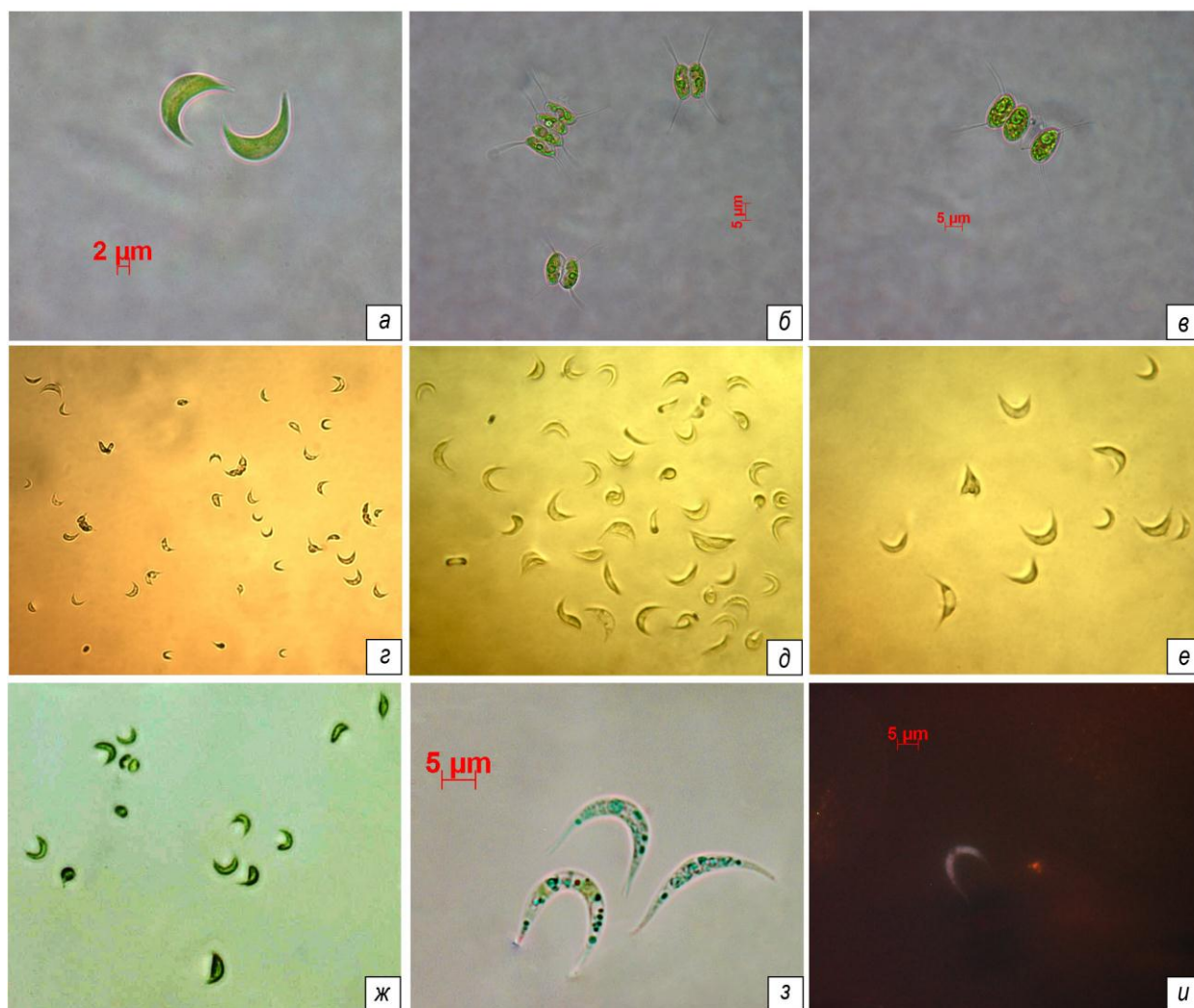


Рисунок. Клетки *Monoraphidium arcuatum* (а, г-и) и *Scenedesmus quadricauda* (б, в):

а – клетки *M. arcuatum* в контрольной культуре;

б – ценобии *S. quadricauda* в контрольной культуре;

в – 4-клеточный ценобий *S. quadricauda* с 1 мертвой клеткой;

г, д, е – клетки *M. arcuatum* при развитии в 10-сут фильтрате контрольной культуры (20-26 сут)

ж - клетки *M. arcuatum* при воздействии 1 мг/л бихромата калия (15 сут);

з – клетки *M. arcuatum* при воздействии 2.5 мг/л бихромата калия (20 сут);

и – мертвая клетка *M. arcuatum* (бихромат, 2.5 мг/л) при облучении УФ в люминесцентном микроскопе

Таблица 1. Средние размеры клеток *Monoraphidium arcuatum* в «молодой» (4-6 сут) и «стареющей» (45-50 сут) культуре

Параметр	Значение	Культура <i>Monoraphidium arcuatum</i>	
		«молодая»	«стареющая»
Ширина, мкм	min	2.55	1.8
	max	4.65	4.5
	среднее	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Осевая длина клетки, мкм	min	14.2	16.8
	max	27.5	28.9
	среднее	21.7 ± 0.8	22.7 ± 0.9
Расстояние между концами клетки, мкм	min	3.4	4.5
	max	16.5	14.7
	среднее	11.2 ± 0.6	10.2 ± 0.7
Перпендикуляр от касательной к линии, соединяющей концы клетки, мкм	min	5.25	7.2
	max	11.25	12.75
	среднее	9.3 ± 0.4	10.1 ± 0.4
Индекс кривизны I_c *	min	0.8	1.3
	max	3.1	4.8
	среднее	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.2
Площадь поверхности (средняя)		112.9 ± 9.8	114.7 ± 10.4
Объем (средний)		105.8 ± 15.8	103.7 ± 16.0
Площадь/Объем (среднее)		1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1

	**Культура <i>Scenedesmus quadricauda</i>
Площадь поверхности (средняя)	111.9 ± 7.6
Объем (средний)	94.6 ± 10.0
Площадь/Объем (среднее)	1.2 ± 0.1

* Индекс кривизны I_c для клеток *Monoraphidium arcuatum* рассчитан как отношение расстояния между концами клеток и перпендикуляра от середины клеток к линии, соединяющей концы

** При расчете параметров клеток *Scenedesmus quadricauda* использованы данные измерений Бойчук Т. В. (Бойчук, 2007)

Таблица 2. Общая (в дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия в колбах (20.05 – 12.07.2010 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.1	1.0	10.0
0	$\frac{8.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{8.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{8.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{8.0 \pm 0.3}{100 \%}$
1	$\frac{13.8 \pm 0.8}{100 \%}$	$\frac{12.7 \pm 2.1}{91.9 \%}$	$\frac{12.9 \pm 1.6}{93.7 \%}$	$\frac{9.6 \pm 2.2}{69.7 \%}$
3	$\frac{44.5 \pm 1.2}{100 \%}$	$\frac{51.0 \pm 8.4}{114.7 \%}$	$\frac{29.3 \pm 2.6}{65.6 \%}$	$\frac{10.4 \pm 0.32}{23.5 \%}$
5	$\frac{96.3 \pm 6.7}{100 \%}$	$\frac{111.7 \pm 10.7}{116.0 \%}$	$\frac{56.4 \pm 10.2}{58.5 \%}$	$\frac{10.1 \pm 2.0}{10.5 \%}$
8	$\frac{232.6 \pm 7.3}{100 \%}$	$\frac{241.3 \pm 27.9}{103.7 \%}$	$\frac{100.7 \pm 25.9}{43.3 \%}$	$\frac{8.6 \pm 1.0}{3.7 \%}$
10	$\frac{284.8 \pm 55.5}{100 \%}$	$\frac{275.2 \pm 24.1}{96.6 \%}$	$\frac{119.1 \pm 20.8}{41.8 \%}$	$\frac{11.0 \pm 1.7}{3.8 \%}$
15	$\frac{508.8 \pm 51.4}{100 \%}$	$\frac{534.2 \pm 81.9}{105.0 \%}$	$\frac{173.3 \pm 19.9}{34.1 \%}$	$\frac{9.3 \pm 2.6}{1.8 \%}$
20	$\frac{650.2 \pm 48.0}{100 \%}$	$\frac{656.7 \pm 58.0}{101.0 \%}$	$\frac{260.08 \pm 73.2}{40.0 \%}$	$\frac{8.26 \pm 3.4}{1.27 \%}$
25	$\frac{745.4 \pm 65.0}{100 \%}$	$\frac{1253.0 \pm 371.9}{107.4 \%}$	$\frac{243.45 \pm 171.4}{32.66 \%}$	$\frac{8.8 \pm 2.6}{0.7 \%}$
47	$\frac{957.2 \pm 146.7}{100 \%}$	$\frac{1115.0 \pm 129.5}{116.5 \%}$	$\frac{360.6 \pm 129.1}{37.7 \%}$	$\frac{7.9 \pm 3.7}{0.8 \%}$
53	$\frac{1167.0 \pm 312.8}{100 \%}$	$\frac{1253.0 \pm 371.9}{107.4 \%}$	$\frac{470.7 \pm 171.4}{40.3 \%}$	$\frac{7.3 \pm 3.1}{0.7 \%}$

Примечание (относится к таблицам 2-9): в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 3. Общая численность клеток *M. arcuatum* (дес. тыс кл/мл) в чистой среде после 53-сут интоксикации бихроматом калия в концентрациях 0.1, 1.0 и 10.0 мг/л (12.07 – 3.08.2010 г.).

Время, сутки	К → К	0.1 → К	1.0 → К	10.0 → К
2	11.6 ± 7.1	6.5 ± 1.5	2.5 ± 1.6	0.1 ± 0.2
22	295.3 ± 64.8	208.2 ± 37.4	324.2 ± 211.6	359.8 ± 81.2

Таблица 4. Общая (дес. тыс кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при действии коллоидного серебра во флаконах (7.02.2011 г.)

Время, сутки	Концентрации коллоидного серебра, мг/л				
	Контроль	0.0001	0.001	0.01	0.1
0	<u>5.5 ± 0.3</u> 100.0 %	<u>5.5 ± 0.3</u> 100.0 %	<u>5.5 ± 0.3</u> 100.0 %	<u>5.5 ± 0.3</u> 100.0 %	<u>5.5 ± 0.3</u> 100.0 %
1	<u>5.9 ± 0.8</u> 100.0 %	<u>6.4 ± 0.3</u> 108.2 %	<u>7.1 ± 0.8</u> 120.2 %	<u>6.5 ± 1.0</u> 110.4 %	<u>5.4 ± 0.5</u> 91.7 %
3	<u>29.4 ± 4.6</u> 100 %	<u>26.4 ± 1.5</u> 89.8 %	<u>27.5 ± 0.3</u> 93.5 %	<u>24.4 ± 3.4</u> 82.8 %	<u>7.0 ± 1.6</u> 23.8 %
5	<u>77.3 ± 6.2</u> 100 %	<u>67.2 ± 7.3</u> 86.9 %	<u>62.9 ± 5.3</u> 81.4 %	<u>69.4 ± 12.0</u> 89.8 %	<u>6.9 ± 0.2</u> 8.9 %
7	<u>151.4 ± 5.0</u> 100 %	<u>147.8 ± 15.0</u> 97.6 %	<u>137.1 ± 5.4</u> 90.6 %	<u>138.1 ± 10.9</u> 91.2 %	<u>17.5 ± 0.5</u> 11.5 %
9	<u>276.8 ± 30.1</u> 100 %	<u>226.9 ± 11.3</u> 82.0 %	<u>214.0 ± 4.6</u> 77.3 %	<u>232.6 ± 10.8</u> 84.0 %	<u>18.8 ± 2.0</u> 6.8 %
15	<u>528.7 ± 17.3</u> 100 %	<u>480.0 ± 22.6</u> 90.8 %	<u>476.7 ± 14.2</u> 90.2 %	<u>485.7 ± 32.6</u> 91.7 %	<u>98.4 ± 7.5</u> 18.6 %
21	<u>810.0 ± 24.6</u> 100 %	<u>703.9 ± 59.1</u> 86.9 %	<u>701.7 ± 52.2</u> 86.6 %	<u>693.9 ± 63.4</u> 85.7 %	<u>320.7 ± 38.3</u> 39.6 %
25	<u>1310.4 ± 62.5</u> 100 %	<u>1021.1 ± 80.0</u> 77.9 %	<u>979.2 ± 20.5</u> 74.7 %	<u>947.8 ± 129.2</u> 72.3 %	<u>568.1 ± 70.8</u> 43.4 %
30	<u>1678.3 ± 34.1</u> 100 %	<u>1340.7 ± 48.5</u> 79.9 %	<u>1228.7 ± 39.8</u> 73.2 %	<u>1176.3 ± 76.8</u> 70.1 %	<u>778.7 ± 46.4</u> 46.4 %

Таблица 4а Содержание живых клеток (% от общего количества) в культуре *Monoraphidium arcuatum* при действии коллоидного серебра во флаконах (7.02.2011 г.)

Время, Сутки	Концентрация коллоидного серебра (мг/л)				
	0 (К)	0.0001	0.001	0.01	0.1
0	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5
1	99.7 ± 0.3	99.4 ± 0.5	99.2 ± 0.7	99.3 ± 0.6	10.2 ± 0.5
3	99.9 ± 0.6	99.9 ± 0.7	99.9 ± 0.7	99.9 ± 0.3	5.1 ± 0.8
5	99.9 ± 0.5	99.9 ± 0.8	99.9 ± 2.1	99.9 ± 0.2	11.7 ± 0.6
7	99.9 ± 1.1	99.9 ± 0.6	99.9 ± 2.8	99.9 ± 0.4	35.0 ± 0.6
9	99.9 ± 0.9	99.9 ± 1.1	99.9 ± 3.2	99.9 ± 0.5	80.2 ± 1.8
15	99.0 ± 1.3	99.0 ± 0.9	99.0 ± 3.3	99.0 ± 0.6	91.8 ± 1.1
21	99.0 ± 1.1	99.0 ± 1.0	98.0 ± 3.5	98.0 ± 0.4	98.2 ± 0.1
25	99.0 ± 1.1	99.0 ± 1.0	98.0 ± 3.5	98.0 ± 0.7	97.5 ± 1.7
30	99.0 ± 1.1	99.0 ± 1.0	98.0 ± 3.5	98.0 ± 0.6	99.0 ± 0.1

Таблица 5. Общая (дес. тыс кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Scenedesmus quadricauda* при действии коллоидного серебра во флаконах (7.02.2011 г.)

Время, сутки	Концентрации коллоидного серебра, мг/л				
	0(Контроль)	0.0001	0.001	0.01	0.1
0	$\frac{5.5 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.3}{100 \%}$
1	$\frac{6.9 \pm 0.4}{100 \%}$	$\frac{6.3 \pm 0.6}{91.7 \%}$	$\frac{6.1 \pm 0.7}{87.9 \%}$	$\frac{6.5 \pm 0.6}{93.9 \%}$	$\frac{5.7 \pm 0.5}{83.1 \%}$
3	$\frac{16.0 \pm 0.9}{100 \%}$	$\frac{17.2 \pm 1.8}{107.4 \%}$	$\frac{15.5 \pm 0.6}{96.8 \%}$	$\frac{15.8 \pm 0.6}{98.9 \%}$	$\frac{6.3 \pm 0.6}{39.6 \%}$
5	$\frac{31.0 \pm 4.7}{100 \%}$	$\frac{37.6 \pm 1.9}{121.3 \%}$	$\frac{33.5 \pm 2.8}{108.0 \%}$	$\frac{36.6 \pm 2.6}{118.0 \%}$	$\frac{6.8 \pm 0.5}{21.9 \%}$
7	$\frac{51.7 \pm 1.7}{100 \%}$	$\frac{61.3 \pm 2.8}{118.7 \%}$	$\frac{61.2 \pm 4.2}{118.4 \%}$	$\frac{64.3 \pm 3.5}{124.5 \%}$	$\frac{7.0 \pm 3.9}{13.5 \%}$
9	$\frac{132.6 \pm 7.3}{100 \%}$	$\frac{128.3 \pm 8.6}{96.8 \%}$	$\frac{166.7 \pm 13.1}{125.7 \%}$	$\frac{155.0 \pm 17.0}{116.9 \%}$	$\frac{12.0 \pm 8.2}{8.8 \%}$
15	$\frac{205.0 \pm 11.3}{100 \%}$	$\frac{203.3 \pm 11.8}{99.2 \%}$	$\frac{253.3 \pm 21.4}{123.4 \%}$	$\frac{207.0 \pm 8.6}{101.0 \%}$	$\frac{16.0 \pm 1.2}{7.8 \%}$
21	$\frac{340.0 \pm 34.0}{100 \%}$	$\frac{388.0 \pm 29.0}{114.2 \%}$	$\frac{440.0 \pm 17.0}{129.4 \%}$	$\frac{386.7 \pm 27.9}{113.7 \%}$	$\frac{22.0 \pm 3.9}{6.5 \%}$
25	$\frac{510.0 \pm 40.8}{100 \%}$	$\frac{583.3 \pm 32.7}{114.4 \%}$	$\frac{500.0 \pm 56.6}{98.0 \%}$	$\frac{423.3 \pm 6.5}{83.01 \%}$	$\frac{220.0 \pm 19.6}{43.1 \%}$
30	$\frac{566.7 \pm 32.7}{100 \%}$	$\frac{613.3 \pm 80.3}{108.2 \%}$	$\frac{496.7 \pm 3.3}{87.6 \%}$	$\frac{436.7 \pm 17.3}{77.1 \%}$	$\frac{305.0 \pm 9.8}{53.8 \%}$

Таблица 5а Содержание живых клеток (% от общего количества) в культуре *Scenedesmus quadricauda* при действии коллоидного серебра во флаконах (7.02.2011 г.)

Время, Сутки	Концентрация коллоидного серебра (мг/л)				
	0 (К)	0.0001	0.001	0.01	0.1
0	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5
1	98.9 ± 0.3	98.4 ± 0.5	98.7 ± 0.6	99.0 ± 0.1	90.2 ± 0.5
3	93.3 ± 0.6	98.9 ± 0.4	98.2 ± 0.7	98.9 ± 0.9	75.5 ± 0.8
5	94.5 ± 0.5	98.6 ± 1.8	96.9 ± 2.1	97.2 ± 2.1	31.8 ± 1.7
7	99.0 ± 1.1	97.4 ± 0.6	96.2 ± 2.3	96.4 ± 4.0	13.5 ± 2.1
9	98.6 ± 0.9	95.9 ± 1.1	97.0 ± 2.4	92.7 ± 2.1	13 ± 0.6
15	96.0 ± 1.3	96.0 ± 0.5	93.2 ± 3.1	91.0 ± 2.6	22 ± 2.2
21	95.0 ± 1.1	94.0 ± 1.2	90.5 ± 0.5	89.6 ± 2.1	27 ± 1.4
25	94.0 ± 1.1	93.0 ± 1.0	91.2 ± 3.1	90.5 ± 2.3	93.0 ± 2.6
30	93.6 ± 1.1	90.5 ± 2.0	90.9 ± 1.5	90.0 ± 1.8	94.5 ± 1.1

Таблица 6. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия в колбах (12.08.2011 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.1	1	10
0	$\frac{5.5 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{8.7 \pm 0.4}{100 \%}$	$\frac{8.2 \pm 1.2}{94.1 \%}$	$\frac{6.4 \pm 0.6}{72.6 \%}$	$\frac{4.6 \pm 0.7}{52.6 \%}$
3	$\frac{31.4 \pm 1.2}{100 \%}$	$\frac{30.8 \pm 1.8}{97.9 \%}$	$\frac{21.8 \pm 1.6}{70.8 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.7}{18.45 \%}$
5	$\frac{92.9 \pm 7.3}{100 \%}$	$\frac{84.9 \pm 1.9}{91.4 \%}$	$\frac{44.8 \pm 3.9}{52.8 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.6}{11.1 \%}$
8	$\frac{160.0 \pm 11.6}{100 \%}$	$\frac{159.9 \pm 6.6}{99.9 \%}$	$\frac{75.3 \pm 1.0}{47.1 \%}$	$\frac{5.0 \pm 1.0}{6.6 \%}$
10	$\frac{255.5 \pm 11.4}{100 \%}$	$\frac{247.8 \pm 8.5}{97.0 \%}$	$\frac{96.1 \pm 4.8}{38.8 \%}$	$\frac{4.9 \pm 1.45}{5.1 \%}$
15	$\frac{349.6 \pm 5.7}{100 \%}$	$\frac{305.0 \pm 17.0}{87.2 \%}$	$\frac{160.2 \pm 1.45}{52.5 \%}$	$\frac{4.3 \pm 0.3}{2.7 \%}$
20	$\frac{407.3 \pm 5.1}{100 \%}$	$\frac{383.4 \pm 19.2}{94.1 \%}$	$\frac{131.0 \pm 6.0}{34.2 \%}$	$\frac{5.2 \pm 1.1}{3.9 \%}$
25	$\frac{421.1 \pm 20.0}{100 \%}$	$\frac{421.0 \pm 38.0}{99.9 \%}$	$\frac{121.75 \pm 9.6}{28.9 \%}$	$\frac{5.14 \pm 0.5}{1.2 \%}$
33	$\frac{445.3 \pm 22.1}{100 \%}$	$\frac{464.2 \pm 44.8}{104.2 \%}$	$\frac{139.6 \pm 5.6}{30.1 \%}$	$\frac{4.1 \pm 0.6}{2.9 \%}$
71	$\frac{892.7 \pm 51.6}{100 \%}$	$\frac{954.2 \pm 96.5}{106.9 \%}$	$\frac{553.3 \pm 86.8}{58.0 \%}$	$\frac{5.0 \pm 1.5}{0.9 \%}$

Таблица 6а. Содержание живых клеток (% от общего количества) в культуре *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия в колбах (12.08.2011 г.)

Время, Сутки	Концентрация бихромата калия (мг/л)			
	0	0.1	1	10
0	99.3 ± 0.5	99.3 ± 0.5	99.3 ± 0.5	99.3 ± 0.5
1	99.2 ± 0.6	99.3 ± 0.8	99.2 ± 0.7	98.1 ± 1.7
3	99.1 ± 0.6	99.2 ± 0.7	99.1 ± 0.7	72.1 ± 3.6
5	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.8	97.2 ± 2.1	55.0 ± 4.8
8	98.2 ± 1.1	99.0 ± 0.6	91.1 ± 2.8	11.3 ± 2.1
10	98.7 ± 0.9	98.5 ± 1.1	90.2 ± 3.2	11.1 ± 2.6
15	98.3 ± 1.3	98.9 ± 0.9	89.0 ± 3.3	9.2 ± 3.0
20	98.4 ± 1.1	98.2 ± 1.0	85.4 ± 3.5	4.1 ± 2.1
25	98.5 ± 0.6	98.0 ± 0.6	84.1 ± 2.5	2.0 ± 0.7
33	98.3 ± 0.8	98.0 ± 1.2	82.3 ± 3.0	0.6 ± 0.4
53	94.2 ± 0.3	94.0 ± 0.6	80.5 ± 0.5	0.6 ± 0.4

Таблица 7. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная численность (% от контроля) клеток *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия в колбах (7.07.2014 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.5	1.0	2.5
0	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$
1	$\frac{30.0 \pm 0.5}{100 \%}$	$\frac{25.3 \pm 3.2}{84.2 \%}$	$\frac{21.1 \pm 2.5}{70.2 \%}$	$\frac{7.2 \pm 1.1}{24.0 \%}$
2	$\frac{56.0 \pm 4.4}{100 \%}$	$\frac{39.5 \pm 6.5}{70.5 \%}$	$\frac{24.7 \pm 5.7}{44.0 \%}$	$\frac{9.7 \pm 1.7}{17.3 \%}$
3	$\frac{123.2 \pm 4.5}{100 \%}$	$\frac{82.5 \pm 8.1}{67.0 \%}$	$\frac{35.6 \pm 4.7}{28.9 \%}$	$\frac{9.6 \pm 2.6}{7.8 \%}$
4	$\frac{189.7 \pm 4.2}{100 \%}$	$\frac{126.2 \pm 4.9}{66.5 \%}$	$\frac{41.7 \pm 5.3}{22.0 \%}$	$\frac{10.0 \pm 1.1}{5.3 \%}$
7	$\frac{309.5 \pm 19.4}{100 \%}$	$\frac{253.2 \pm 14.6}{81.8 \%}$	$\frac{89.8 \pm 18.0}{29.0 \%}$	$\frac{9.6 \pm 2.2}{3.4 \%}$
10	$\frac{522.0 \pm 20.2}{100 \%}$	$\frac{420.2 \pm 31.3}{80.5 \%}$	$\frac{216.1 \pm 26.5}{41.4 \%}$	$\frac{7.3 \pm 1.1}{1.4 \%}$
15	$\frac{693.4 \pm 49.2}{100 \%}$	$\frac{527.0 \pm 23.8}{76.0 \%}$	$\frac{332.8 \pm 31.6}{48.0 \%}$	$\frac{10.4 \pm 0.7}{1.5 \%}$
17	$\frac{750.8 \pm 63.3}{100 \%}$	$\frac{563.3 \pm 4.3}{75.0 \%}$	$\frac{370.0 \pm 39.6}{49.3 \%}$	$\frac{10.5 \pm 0.7}{1.4 \%}$
20	$\frac{802.4 \pm 70.6}{100 \%}$	$\frac{620.2 \pm 14.7}{77.3 \%}$	$\frac{418.0 \pm 34.1}{52.1 \%}$	$\frac{9.6 \pm 1.1}{1.2 \%}$
25	$\frac{895.4 \pm 89.1}{100 \%}$	-	-	-

Таблица 7а. Содержание живых клеток (% от общего количества) в культуре *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия в колбах (7.07.2014 г.)

Время, Сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.5	1.0	2.5
0	99.8 ± 0.2	99.8 ± 0.2	99.8 ± 0.2	99.8 ± 0.2
2	99.5 ± 0.3	98.5 ± 0.3	98.6 ± 0.3	98.5 ± 0.3
4	99.2 ± 0.3	99.3 ± 0.3	98.3 ± 0.3	98.3 ± 0.3
5	99.4 ± 0.3	99.0 ± 0.3	97.6 ± 0.3	89.5 ± 0.3
7	99.0 ± 0.3	98.5 ± 0.3	97.7 ± 0.3	86.9 ± 0.3
10	98.5 ± 0.3	98.0 ± 0.2	97.4 ± 0.8	67.0 ± 3.0
17	98.2 ± 0.5	98.7 ± 0.3	97.4 ± 0.4	55.2 ± 1.0
20	98.1 ± 0.6	98.2 ± 0.5	96.6 ± 0.5	43.0 ± 0.3

Таблица 8. Общая (в дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия во флаконах (7.07.2014 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л					
	Контроль	0.1	0.5	1.0	2.5	10
0	5.0 ± 0.3 100 %	5.0 ± 0.3 100 %	5.0 ± 0.3 100 %	5.0 ± 0.3 100 %	5.0 ± 0.3 100 %	5.0 ± 0.3 100 %
1	28.0 ± 1.1 100 %	24.4 ± 2.7 87.1 %	23.5 ± 1.4 83.9 %	17.4 ± 1.2 71.2 %	6.2 ± 0.4 22.1 %	5.1 ± 0.6 18.2 %
2	48.7 ± 4.6 100 %	37.8 ± 6.0 77.7 %	33.0 ± 7.9 67.8 %	21.8 ± 2.8 44.9 %	7.8 ± 1.2 16.1 %	5.2 ± 1.7 10.8 %
3	92.0 ± 7.1 100 %	78.1 ± 4.9 84.9 %	60.9 ± 1.6 66.2 %	25.0 ± 1.1 32.0 %	7.2 ± 0.3 7.8 %	5.9 ± 0.6 6.4 %
4	136.3 ± 1.7 100 %	122.3 ± 4.7 89.7 %	89.7 ± 24.9 65.8 %	38.5 ± 2.5 28.2 %	8.2 ± 0.8 6.0 %	5.9 ± 2.6 4.3 %
7	337.5 ± 36.8 100%	252.5 ± 27.9 74.8 %	254.2 ± 34.0 75.3 %	85.5 ± 11.5 25.3 %	10.8 ± 2.2 3.2 %	8.0 ± 2.5 2.4 %
10	505.0 ± 34.4 100 %	459.0 ± 24.1 90.9 %	374.4 ± 10.9 74.1 %	175.8 ± 16.6 34.8 %	6.6 ± 0.6 1.3 %	5.6 ± 0.3 1.1 %
15	760.0 ± 37.1 100%	646.0 ± 28.4 85.0 %	490.2 ± 58.9 64.5 %	307.7 ± 19.8 40.5%	8.4 ± 0.9 1.1 %	6.4 ± 0.6 0.8 %
17	855.0 ± 74.0 100%	687.5 ± 111.0 80.4 %	492.5 ± 90.7 57.6 %	358.3 ± 16.3 41.9 %	8.7 ± 2.3 1.0 %	6.8 ± 3.6 0.8 %
20	1100.0 ± 79.2 100%	896.7 ± 54.0 81.5 %	726.0 ± 21.0 66.0 %	478.3 ± 22.9 43.5 %	9.4 ± 0.8 0.9 %	7.8 ± 0.5 0.7 %
25	1500.0 ± 109 100%	-	-	-	-	-

Таблица 8а. Содержание живых клеток (% от общего количества) в культуре *Monoraphidium arcuatum* при действии бихромата калия во флаконах (7.07.2014 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л					
	Контроль	0.1	0.5	1.0	2.5	10
0	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3
2	98.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	97.5 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3
4	99.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	97.3 ± 0.3	97.0 ± 0.3	65.0 ± 0.3
7	98.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	97.0 ± 0.3	85.0 ± 0.3	32.0 ± 0.3
10	99.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	98.0 ± 0.3	68.0 ± 0.3	10.5 ± 2.9
17	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	32.0 ± 0.3	7.0 ± 0.6
20	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	99.0 ± 0.3	28.0 ± 4.2	5.0 ± 1.0

Таблица 9. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при действии коллоидного серебра (0.1 мг/л) в колбах (15.03.2012 г.)

Время, сутки	<i>Monoraphidium arcuatum</i>		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	
	Контроль	0.1 мг Ag/л	Контроль	0.1 мг Ag/л
0	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$
1	$\frac{19.0 \pm 4.3}{100 \%}$	$\frac{5.1 \pm 0.5}{26.8 \%}$	$\frac{20.5 \pm 1.0}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 1.0}{24.4 \%}$
2	$\frac{31.5 \pm 8.3}{100 \%}$	$\frac{5.2 \pm 0.2}{16.5 \%}$	$\frac{34.5 \pm 1.5}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 1.0}{14.5 \%}$
3	$\frac{78.0 \pm 1.6}{100 \%}$	$\frac{5.1 \pm 0.4}{6.5 \%}$	$\frac{57.0 \pm 2.0}{100 \%}$	$\frac{4.0 \pm 2.0}{7.0 \%}$
5	$\frac{172.0 \pm 25.5}{100 \%}$	$\frac{5.5 \pm 0.6}{3.2 \%}$	$\frac{97.0 \pm 19.6}{100 \%}$	$\frac{7.0 \pm 0.3}{7.2 \%}$
7	$\frac{246.0 \pm 73.5}{100 \%}$	$\frac{8.5 \pm 1.0}{3.4 \%}$	$\frac{127.1 \pm 7.7}{100 \%}$	$\frac{3.0 \pm 0.4}{2.4 \%}$
10	$\frac{362.4 \pm 76.2}{100 \%}$	$\frac{8.5 \pm 1.1}{2.3 \%}$	$\frac{218.0 \pm 39.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.25}{2.1 \%}$
15	$\frac{411.2 \pm 23.0}{100 \%}$	$\frac{7.5 \pm 0.9}{1.8 \%}$	$\frac{256.0 \pm 2.0}{100 \%}$	$\frac{4.5 \pm 2.0}{1.8 \%}$
21	$\frac{433.8 \pm 17.2}{100 \%}$	$\frac{34.1 \pm 2.9}{7.9 \%}$	$\frac{300.0 \pm 19.6}{100 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.45}{1.3 \%}$
25	$\frac{515.0 \pm 50.0}{100 \%}$	$\frac{154.5 \pm 8.0}{30.0 \%}$	$\frac{328.0 \pm 9.8}{100 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.7}{1.2 \%}$
30	$\frac{596.0 \pm 47.0}{100 \%}$	$\frac{321.5 \pm 12.3}{53.9 \%}$	$\frac{424.0 \pm 19.6}{100 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.65}{0.9 \%}$
40	-	-	$\frac{450.0 \pm 28.4}{100 \%}$	$\frac{4.5 \pm 1.2}{1.0 \%}$
52	-	-	$\frac{480.0 \pm 31.0}{100 \%}$	$\frac{35.0 \pm 3.6}{7.3 \%}$
60	-	-	$\frac{500.0 \pm 15.6}{100 \%}$	$\frac{240.0 \pm 14.8}{48 \%}$

Таблица 9а. Содержание живых клеток (% от общего количества) в культуре *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* при действии 0.1 мг/л коллоидного серебра (15.03.2012 г.)

Время, сутки	<i>Monoraphidium arcuatum</i>		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	
	Контроль	0.1 мг Ag/л	Контроль	0.1 мг Ag/л
2	98.0 ± 0.3	30.0 ± 0.5	97.9 ± 0.9	39 ± 4.6
5	98.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	92.0 ± 4.0	2.0 ± 0.6
7	99.0 ± 0.7	2.0 ± 0.6	93.0 ± 0.3	1.8 ± 0.3
10	97.0 ± 0.8	2.0 ± 0.4	95.0 ± 0.3	1.5 ± 0.7
15	95.0 ± 1.4	10.0 ± 0.3	94.5 ± 0.7	1.2 ± 0.6
21	97.0 ± 0.9	32.0 ± 0.3	91.5 ± 1.2	1.3 ± 0.7
25	98.0 ± 1.3	61.0 ± 3.6	90.0 ± 0.9	0.5 ± 0.2
30	94.0 ± 1.5	67.0 ± 2.4	87.5 ± 0.7	0.7 ± 0.5
60	-	-	75.0 ± 3.9	74.3 ± 0.7

Таблица 10. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Monoraphidium arcuatum* в чистой во флаконах среде после интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2, 5, 7, 10 и 21 суток (март-апрель 2012 г.)

Время, сутки	Продолжительность интоксикации коллоидным серебром (сутки)				
	2	5	7	10	21
0	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{5.4 \pm 0.4}{91.8 \%}$	$\frac{5.8 \pm 0.6}{21.2 \%}$	$\frac{5.8 \pm 0.3}{65.0 \%}$	$\frac{7.0 \pm 0.3}{70.2 \%}$	$\frac{8.1 \pm 0.7}{48.9 \%}$
3	$\frac{9.0 \pm 0.6}{16.6 \%}$	$\frac{7.0 \pm 0.9}{9.5 \%}$	$\frac{6.0 \pm 1.1}{9.3 \%}$	$\frac{8.2 \pm 0.9}{15.4 \%}$	$\frac{29.7 \pm 2.0}{42.1 \%}$
5	$\frac{12.2 \pm 2.6}{8.5 \%}$	$\frac{7.7 \pm 2.7}{5.2 \%}$	$\frac{5.0 \pm 1.1}{3.25 \%}$	$\frac{7.8 \pm 0.6}{6.5 \%}$	$\frac{81.8 \pm 6.0}{47.2 \%}$
7	$\frac{34.6 \pm 4.3}{12.5 \%}$	$\frac{6.2 \pm 1.4}{1.7 \%}$	$\frac{6.5 \pm 3.3}{2.9 \%}$	$\frac{7.7 \pm 0.3}{3.9 \%}$	$\frac{196.1 \pm 18.0}{53.8 \%}$
10	$\frac{143.5 \pm 18.7}{38.5 \%}$	$\frac{12.6 \pm 3.4}{3.2 \%}$	$\frac{10.6 \pm 0.6}{2.5 \%}$	$\frac{10.0 \pm 0.3}{2.6 \%}$	$\frac{378.2 \pm 33.2}{66.9 \%}$
15	$\frac{335.8 \pm 4.3}{56.1 \%}$	$\frac{126.0 \pm 87.2}{18.8 \%}$	$\frac{187.5 \pm 12.3}{26.1 \%}$	$\frac{54.0 \pm 7.9}{7.6 \%}$	$\frac{655.6 \pm 92.0}{86.4 \%}$
20	$\frac{631.7 \pm 40.9}{66.4 \%}$	$\frac{355.8 \pm 36.9}{36.6 \%}$	$\frac{530.8 \pm 42.0}{52.8 \%}$	$\frac{392.5 \pm 31.9}{33.1 \%}$	$\frac{757.0 \pm 16.9}{78.6 \%}$
25	$\frac{991.7 \pm 111.2}{68.2 \%}$	$\frac{836.7 \pm 68.4}{59.9 \%}$	$\frac{1123.3 \pm 14.2}{74.2 \%}$	$\frac{883.5 \pm 104.3}{82.4 \%}$	$\frac{809.7 \pm 53.6}{81.0 \%}$
30	$\frac{1431.5 \pm 54.1}{83.1 \%}$	$\frac{1082.0 \pm 65.7}{80.6 \%}$	$\frac{907.2 \pm 160.1}{68.8 \%}$	$\frac{1124.1 \pm 259.9}{92.8 \%}$	$\frac{872.3 \pm 24.4}{72.7 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Контролем служили данные из Таблицы 13 Приложения. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 11. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность интактных клеток *Monoraphidium arcuatum* в фильтратах опытной культуры *Monoraphidium arcuatum* (во флаконах), полученных после 2, 5, 7, 10 и 21 суток интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) (март-апрель 2012)

Время, сутки	Продолжительность интоксикации коллоидным серебром (сутки)				
	2	5	7	10	21
0	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{5.3 \pm 0.3}{89.2 \%}$	$\frac{12.8 \pm 0.7}{46.7 \%}$	$\frac{5.6 \pm 0.4}{62.8 \%}$	$\frac{8.5 \pm 0.3}{85.6 \%}$	$\frac{20.6 \pm 2.8}{123.8 \%}$
3	$\frac{27.6 \pm 2.3}{50.9 \%}$	$\frac{54.6 \pm 3.7}{74.5 \%}$	$\frac{40.5 \pm 8.5}{63.5 \%}$	$\frac{38.3 \pm 2.6}{71.9 \%}$	$\frac{55.3 \pm 5.3}{78.3 \%}$
5	$\frac{55.5 \pm 3.0}{38.7 \%}$	$\frac{115.5 \pm 9.6}{78.8 \%}$	$\frac{101.8 \pm 18.0}{66.1 \%}$	$\frac{81.3 \pm 7.8}{67.2 \%}$	$\frac{93.7 \pm 19.9}{54.1 \%}$
7	$\frac{111.5 \pm 14.3}{40.4 \%}$	$\frac{158.2 \pm 16.7}{42.4 \%}$	$\frac{166.3 \pm 15.3}{74.0 \%}$	$\frac{84.0 \pm 9.9}{42.5 \%}$	$\frac{167.0 \pm 19.9}{45.8 \%}$
10	$\frac{205.0 \pm 16.8}{55.0 \%}$	$\frac{295.0 \pm 35.3}{74.7 \%}$	$\frac{298.8 \pm 83.9}{69.9 \%}$	$\frac{134.3 \pm 36.3}{35.1 \%}$	$\frac{263.8 \pm 37.6}{46.7 \%}$
15	$\frac{395.5 \pm 56.5}{66.1 \%}$	$\frac{465.0 \pm 52.0}{69.3 \%}$	$\frac{528.3 \pm 156.2}{73.6 \%}$	$\frac{201.5 \pm 59.4}{28.2 \%}$	$\frac{391.7 \pm 35.5}{51.6 \%}$
20	$\frac{692.5 \pm 163.8}{72.8 \%}$	$\frac{672.5 \pm 48.3}{69.2 \%}$	$\frac{675.0 \pm 39.2}{67.1 \%}$	$\frac{342.5 \pm 121.4}{28.9 \%}$	$\frac{492.7 \pm 94.7}{51.2 \%}$
25	$\frac{1196.4 \pm 89.1}{82.3 \%}$	$\frac{833.3 \pm 89.2}{59.6 \%}$	$\frac{1253.3 \pm 109.4}{82.8 \%}$	$\frac{488.4 \pm 211.5}{45.6 \%}$	$\frac{514.0 \pm 45.4}{51.4 \%}$
30	$\frac{1226.8 \pm 181.1}{71.2 \%}$	$\frac{1063.0 \pm 186.2}{79.2 \%}$	$\frac{1168.1 \pm 122.1}{88.6 \%}$	$\frac{543.5 \pm 240.4}{44.9 \%}$	$\frac{607.7 \pm 85.9}{50.6 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Контролем служили данные из Таблицы 13 Приложения. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 12. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность интактных клеток *Monoraphidium arcuatum* в фильтратах контрольной культуры *Monoraphidium arcuatum* (во флаконах), полученных на 7, 10 и 21 сутки ее развития (март-апрель 2012)

Время, сутки	Возраст контрольной культуры (сутки)		
	7	10	21
0	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{5.1 \pm 0.2}{56.7 \%}$	$\frac{15.1 \pm 0.3}{152.3 \%}$	$\frac{19.5 \pm 2.4}{117.2 \%}$
3	$\frac{43.3 \pm 2.4}{67.9 \%}$	$\frac{43.6 \pm 1.2}{81.8 \%}$	$\frac{39.9 \pm 2.6}{56.5 \%}$
5	$\frac{113.2 \pm 1.5}{73.5 \%}$	$\frac{77.2 \pm 16.2}{63.8 \%}$	$\frac{44.2 \pm 9.3}{25.5 \%}$
7	$\frac{180.0 \pm 9.8}{80.1 \%}$	$\frac{99.2 \pm 32.8}{50.2 \%}$	$\frac{47.7 \pm 0.4}{13.1 \%}$
10	$\frac{440.0 \pm 19.6}{102.9 \%}$	$\frac{115.0 \pm 49.0}{30.1 \%}$	$\frac{49.8 \pm 2.4}{8.8 \%}$
15	$\frac{653.8 \pm 36.8}{91.1 \%}$	$\frac{138.2 \pm 55.4}{19.4 \%}$	$\frac{53.7 \pm 3.3}{7.1 \%}$
20	$\frac{846.2 \pm 85.8}{84.1 \%}$	$\frac{147.0 \pm 30.4}{12.4 \%}$	$\frac{76.8 \pm 12.4}{8.0 \%}$
25	$\frac{1119.0 \pm 11.8}{73.9 \%}$	$\frac{186.0 \pm 20.7}{17.4 \%}$	$\frac{63.6 \pm 0.4}{6.7 \%}$
30	$\frac{713.0 \pm 10.4}{54.1 \%}$	$\frac{151.4 \pm 41.4}{12.5 \%}$	$\frac{74.8 \pm 13.9}{6.2 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Контролем служили данные из Таблицы 13 Приложения. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$).

Таблица 13. Численность интактных клеток (дес. тыс. кл/мл) *Monoraphidium arcuatum* при развитии в чистой среде во флаконах как контроль к развитию интактных клеток в фильтрах и опытных клеток, полученных после 2, 5, 7, 10 и 21 суток интоксикации опытных культур коллоидным серебром (0.1 мг/л) (март-май 2012)

Время, сутки	Сутки роста опытных культур для фильтрации				
	2	5	7	10	21
0	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2
1	5.9 ± 0.8	27.4 ± 1.6	9.0 ± 0.3	9.9 ± 0.5	16.6 ± 4.4
3	54.2 ± 1.4	73.3 ± 5.6	63.8 ± 4.9	53.3 ± 2.4	70.6 ± 0.6
5	143.5 ± 8.7	146.5 ± 4.9	154.0 ± 6.1	121.0 ± 16.5	173.3 ± 17.1
7	275.8 ± 14.2	373.1 ± 9.4	224.7 ± 20.9	197.5 ± 13.0	364.7 ± 46.8
10	373.1 ± 9.4	394.7 ± 18.2	427.5 ± 21.4	382.5 ± 34.3	565.0 ± 59.9
15	598.3 ± 13.4	670.8 ± 63.0	717.5 ± 39.6	713.8 ± 22.1	758.6 ± 3.2
20	950.8 ± 54.9	972.5 ± 25.1	1005.8 ± 100.4	1184.7 ± 124.2	962.9 ± 44.9
25	1454.2 ± 197.9	1397.3 ± 193.4	1514.0 ± 29.9	1072.1 ± 134.6	999.9 ± 97.0
30	1723.0 ± 41.4	1342.8 ± 79.5	1318.6 ± 45.0	1211.1 ± 55.3	1200.6 ± 47.3

Таблица 14. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность клеток *Scenedesmus quadricauda* в чистой среде во флаконах после интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2, 5, 7, 10, 21 и 30 суток (март-май 2012 г.)

Время, сутки	Продолжительность контакта с коллоидным серебром (сутки)					
	2	5	7	10	21	30
0	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{4.7 \pm 0.2}{64.2 \%}$	$\frac{4.7 \pm 0.2}{41.8 \%}$	$\frac{4.3 \pm 0.4}{55.3 \%}$	$\frac{5.1 \pm 0.2}{40.1 \%}$	$\frac{7.9 \pm 0.3}{78.3 \%}$	$\frac{4.5 \pm 0.6}{41.3 \%}$
3	$\frac{4.0 \pm 0.6}{27.0 \%}$	$\frac{5.1 \pm 0.7}{15.5 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.4}{15.5 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.4}{13.2 \%}$	$\frac{8.0 \pm 0.6}{22.9 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.3}{15.0 \%}$
5	$\frac{4.5 \pm 0.3}{6.8 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.4}{6.2 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.5}{7.6 \%}$	$\frac{5.8 \pm 0.9}{9.2 \%}$	$\frac{6.7 \pm 2.1}{10.4 \%}$	$\frac{7.9 \pm 0.5}{13.7 \%}$
7	$\frac{4.5 \pm 1.0}{5.7 \%}$	$\frac{4.0 \pm 0.6}{3.2 \%}$	$\frac{4.7 \pm 1.3}{3.7 \%}$	$\frac{5.2 \pm 0.3}{7.4 \%}$	$\frac{4.8 \pm 0.3}{5.4 \%}$	$\frac{11.3 \pm 8.6}{11.6 \%}$
10	$\frac{4.8 \pm 2.7}{2.0 \%}$	$\frac{4.8 \pm 0.3}{2.0 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{3.2 \%}$	$\frac{4.2 \pm 0.9}{1.5 \%}$	$\frac{5.0 \pm 1.1}{3.2 \%}$	$\frac{20.5 \pm 1.1}{9.7 \%}$
15	$\frac{12.2 \pm 7.6}{3.6 \%}$	$\frac{22.9 \pm 8.5}{5.4 \%}$	$\frac{12.7 \pm 11.6}{2.8 \%}$	$\frac{6.4 \pm 1.0}{1.3 \%}$	$\frac{13.3 \pm 2.6}{3.3 \%}$	$\frac{28.0 \pm 1.1}{6.1 \%}$
20	$\frac{126.3 \pm 26.3}{26.7 \%}$	$\frac{140.0 \pm 5.7}{25.0 \%}$	$\frac{67.5 \pm 32.8}{14.6 \%}$	$\frac{42.3 \pm 6.6}{7.1 \%}$	$\frac{43.3 \pm 20.6}{8.2 \%}$	$\frac{24.0 \pm 2.3}{4.8 \%}$
25	$\frac{205.0 \pm 64.3}{40.0 \%}$	$\frac{366.7 \pm 71.2}{61.6 \%}$	$\frac{171.8 \pm 24.3}{34.1 \%}$	$\frac{205.0 \pm 48.3}{34.8 \%}$	$\frac{106.5 \pm 4.0}{18.3 \%}$	$\frac{215.0 \pm 22.6}{40.7 \%}$
30	$\frac{360.3 \pm 13.7}{64.8 \%}$	$\frac{530.7 \pm 62.8}{92.0 \%}$	$\frac{442.5 \pm 48.1}{73.1 \%}$	$\frac{435.0 \pm 65.2}{68.0 \%}$	$\frac{175.0 \pm 28.3}{23.7 \%}$	$\frac{340.0 \pm 17.0}{49.3 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Контролем служили данные из Таблицы 17 Приложения. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 15. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность интактных клеток *Scenedesmus quadricauda* (во флаконах) в фильтратах опытной культуры *Scenedesmus quadricauda*, полученных после интоксикации коллоидным серебром (0.1 мг/л) в течение 2, 5, 7, 10, 21 и 30 суток (март-апрель 2012)

Время, сутки	Продолжительность контакта с коллоидным серебром (сутки)					
	2	5	7	10	21	30
0	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{4.8 \pm 0.3}{66.7 \%}$	$\frac{4.9 \pm 0.3}{43.8 \%}$	$\frac{3.9 \pm 0.2}{50.4 \%}$	$\frac{5.2 \pm 0.3}{40.8 \%}$	$\frac{10.2 \pm 0.4}{101.3 \%}$	$\frac{8.1 \pm 0.4}{74.3 \%}$
3	$\frac{6.0 \pm 0.6}{40.4 \%}$	$\frac{9.9 \pm 1.4}{30.1 \%}$	$\frac{6.1 \pm 0.4}{26.8 \%}$	$\frac{13.1 \pm 3.4}{34.5 \%}$	$\frac{34.7 \pm 1.9}{99.3 \%}$	$\frac{18.3 \pm 3.6}{68.8 \%}$
5	$\frac{20.5 \pm 7.4}{35.0 \%}$	$\frac{23.2 \pm 1.3}{36.0 \%}$	$\frac{14.5 \pm 5.5}{27.6 \%}$	$\frac{27.7 \pm 3.5}{43.5 \%}$	$\frac{61.0 \pm 22.7}{95.3 \%}$	$\frac{51.7 \pm 2.5}{89.4 \%}$
7	$\frac{31.8 \pm 2.6}{40.5 \%}$	$\frac{49.0 \pm 1.1}{39.4 \%}$	$\frac{44.7 \pm 11.7}{35.5 \%}$	$\frac{47.3 \pm 1.3}{67.8 \%}$	$\frac{94.8 \pm 3.2}{107.8 \%}$	$\frac{91.7 \pm 34.2}{94.0 \%}$
10	$\frac{99.8 \pm 2.0}{41.5 \%}$	$\frac{122.2 \pm 13.7}{50.9 \%}$	$\frac{69.0 \pm 11.8}{44.0 \%}$	$\frac{167.5 \pm 10.2}{59.8 \%}$	$\frac{168.3 \pm 5.9}{106.5 \%}$	$\frac{157.3 \pm 2.8}{74.7 \%}$
15	$\frac{215.3 \pm 11.9}{63.5 \%}$	$\frac{310.0 \pm 67.9}{72.7 \%}$	$\frac{317.5 \pm 98.4}{69.0 \%}$	$\frac{401.7 \pm 17.3}{84.7 \%}$	$\frac{335.0 \pm 45.3}{82.7 \%}$	$\frac{338.3 \pm 44.0}{73.6 \%}$
20	$\frac{272.8 \pm 23.0}{57.8 \%}$	$\frac{452.5 \pm 17.2}{80.8 \%}$	$\frac{403.3 \pm 40.4}{87.4 \%}$	$\frac{611.7 \pm 36.4}{102.5 \%}$	$\frac{550.0 \pm 19.6}{104.3 \%}$	$\frac{457.5 \pm 14.1}{90.9 \%}$
25	$\frac{436.7 \pm 29.0}{85.2 \%}$	$\frac{608.3 \pm 43.2}{102.2 \%}$	$\frac{508.3 \pm 34.6}{100.8 \%}$	$\frac{606.7 \pm 80.5}{103.1 \%}$	$\frac{507.5 \pm 34.3}{87.0 \%}$	$\frac{527.5 \pm 59.4}{99.8 \%}$
30	$\frac{526.7 \pm 23.5}{94.7 \%}$	$\frac{535.0 \pm 83.7}{92.8 \%}$	$\frac{626.7 \pm 6.5}{103.6 \%}$	$\frac{620.0 \pm 58.8}{96.9 \%}$	$\frac{740.0 \pm 45.3}{100.3 \%}$	$\frac{690.0 \pm 0.3}{100.0 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Контролем служили данные из Таблицы 17 Приложения. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 16. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная (% от контроля) численность интактных клеток *Scenedesmus quadricauda* (во флаконах) в фильтрах контрольной культуры *Scenedesmus quadricauda*, полученных на 2, 5, 7, 21 и 30 сутки ее развития (март-апрель 2012)

Время, сутки	Возраст контрольной культуры (сутки)			
	2	7	21	30
0	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.2}{100 \%}$
1	$\frac{7.3 \pm 0.3}{100.7 \%}$	$\frac{7.8 \pm 0.7}{99.8 \%}$	$\frac{9.7 \pm 0.2}{96.4 \%}$	$\frac{5.2 \pm 0.6}{47.7 \%}$
3	$\frac{15.2 \pm 0.5}{102.8 \%}$	$\frac{22.5 \pm 2.0}{98.8 \%}$	$\frac{13.2 \pm 0.2}{37.8 \%}$	$\frac{8.0 \pm 2.0}{30.0 \%}$
5	$\frac{67.0 \pm 13.7}{114.5 \%}$	$\frac{51.0 \pm 2.0}{97.1 \%}$	$\frac{23.5 \pm 2.9}{36.7 \%}$	$\frac{20.0 \pm 3.9}{34.6 \%}$
7	$\frac{80.5 \pm 1.0}{102.3 \%}$	$\frac{121.5 \pm 16.7}{96.6 \%}$	$\frac{31.0 \pm 3.9}{35.2 \%}$	$\frac{29.0 \pm 7.8}{29.7 \%}$
10	$\frac{162.5 \pm 4.9}{67.5 \%}$	$\frac{158.5 \pm 2.9}{101.2 \%}$	$\frac{33.8 \pm 2.4}{21.4 \%}$	$\frac{30.0 \pm 0.3}{14.2 \%}$
15	$\frac{305.0 \pm 3.9}{89.9 \%}$	$\frac{355.0 \pm 9.8}{77.2 \%}$	$\frac{27.8 \pm 6.4}{6.8 \%}$	$\frac{41.0 \pm 2.0}{8.9 \%}$
20	$\frac{472.5 \pm 4.9}{100.0 \%}$	$\frac{332.5 \pm 4.9}{72.0 \%}$	$\frac{45.0 \pm 13.7}{8.5 \%}$	$\frac{51.0 \pm 5.9}{10.1 \%}$
25	$\frac{452.5 \pm 102.9}{88.3 \%}$	$\frac{519.0 \pm 5.9}{103.0 \%}$	$\frac{45.0 \pm 2.0}{7.7 \%}$	$\frac{50.5 \pm 1.0}{9.6 \%}$
30	$\frac{505.0 \pm 11.8}{90.8 \%}$	$\frac{500.0 \pm 39.2}{82.6 \%}$	$\frac{55.0 \pm 0.3}{7.5 \%}$	$\frac{47.0 \pm 3.9}{6.8 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Контролем служили данные из Таблицы 17 Приложения. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 17. Численность интактных клеток (дес. тыс. кл/мл) *Scenedesmus quadricauda* при развитии в чистой среде во флаконах как контроль к развитию интактных клеток в фильтрах и опытных клеток, полученных после 2, 5, 7, 10, 21 и 30 суток интоксикации опытных культур коллоидным серебром (0.1 мг/л) (март-май 2012)

Время, сутки	Сутки роста опытных культур для фильтрации					
	2	5	7	10	21	30
0	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2
1	7.3 ± 0.4	11.2 ± 0.4	7.8 ± 0.9	12.7 ± 0.5	10.1 ± 0.8	10.9 ± 1.1
3	14.8 ± 4.1	32.9 ± 4.3	22.8 ± 2.3	37.9 ± 3.9	34.9 ± 2.4	26.7 ± 2.4
5	58.5 ± 5.4	64.3 ± 2.4	52.5 ± 13.0	63.7 ± 3.3	64.0 ± 16.3	57.8 ± 5.0
7	78.7 ± 5.5	124.5 ± 11.4	125.8 ± 15.3	69.8 ± 19.9	88.0 ± 5.2	97.5 ± 8.5
10	240.7 ± 25.2	240.2 ± 8.2	156.7 ± 3.3	280.3 ± 29.2	158.0 ± 15.3	210.7 ± 8.5
15	339.2 ± 25.7	426.7 ± 13.1	460.0 ± 9.8	474.3 ± 26.0	405.0 ± 5.7	460.0 ± 20.4
20	472.3 ± 32.0	560.0 ± 34.4	461.5 ± 20.1	596.7 ± 51.0	527.3 ± 30.3	503.3 ± 3.3
25	512.5 ± 19.8	595.0 ± 44.9	504.2 ± 39.2	588.3 ± 138.6	583.3 ± 40.1	528.3 ± 11.2
30	556.0 ± 45.6	576.7 ± 36.4	605.0 ± 17.0	640.0 ± 67.9	737.5 ± 70.7	690.0 ± 11.3

Таблица 18. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная численность (% от контроля) клеток дважды синхронизированной культуры *Monoraphidium arcuatum* в колбах при действии бихромата калия при исходной численности клеток 20 тыс.кл./мл (октябрь 2013 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.5	1.5	3
0	$\frac{2.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{2.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{2.0 \pm 0.2}{100 \%}$	$\frac{2.0 \pm 0.2}{100 \%}$
2	$\frac{18.3 \pm 1.2}{100 \%}$	$\frac{11.7 \pm 4.0}{63.6 \%}$	$\frac{5.2 \pm 1.7}{28.2 \%}$	$\frac{2.8 \pm 1.7}{15.5 \%}$
4	$\frac{95.2 \pm 15.1}{100 \%}$	$\frac{52.0 \pm 13.7}{54.6 \%}$	$\frac{6.42 \pm 0.9}{6.7 \%}$	$\frac{2.7 \pm 0.9}{2.8 \%}$
7	$\frac{421.7 \pm 50.2}{100 \%}$	$\frac{265.7 \pm 35.9}{63.0 \%}$	$\frac{9.8 \pm 2.2}{52.8 \%}$	$\frac{3.1 \pm 0.9}{0.7 \%}$
10	$\frac{466.7 \pm 90.8}{100 \%}$	$\frac{382.5 \pm 27.0}{82.0 \%}$	$\frac{20.5 \pm 8.8}{4.4 \%}$	$\frac{3.8 \pm 1.2}{0.8 \%}$

Таблица 19. Общая (дес. тыс. кл/мл) и относительная численность (% от контроля) клеток дважды синхронизированной культуры *Monoraphidium arcuatum* в колбах при действии бихромата калия при исходной численности клеток 50 тыс.кл./мл (октябрь 2013 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.5	1.5	3
0	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$	$\frac{5.0 \pm 0.3}{100 \%}$
2	$\frac{55.0 \pm 4.6}{100 \%}$	$\frac{33.3 \pm 1.6}{60.6 \%}$	$\frac{11.5 \pm 2.5}{20.9 \%}$	$\frac{5.5 \pm 1.5}{52.6 \%}$
4	$\frac{198.7 \pm 30.8}{100 \%}$	$\frac{116.8 \pm 17.1}{58.8 \%}$	$\frac{19.3 \pm 2.1}{9.7 \%}$	$\frac{6.4 \pm 1.9}{3.2 \%}$
7	$\frac{441.7 \pm 65.3}{100 \%}$	$\frac{265.0 \pm 33.4}{60.0 \%}$	$\frac{22.3 \pm 13.2}{5.1 \%}$	$\frac{7.9 \pm 1.1}{1.8 \%}$
10	$\frac{490.0 \pm 11.3}{100 \%}$	$\frac{335.2 \pm 29.7}{68.4 \%}$	$\frac{30.2 \pm 12.2}{6.2 \%}$	$\frac{9.7 \pm 0.6}{2.0 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 20. Численность клеток *Monoraphidium arcuatum* в смешанной с *Scenedesmus quadricauda* культуре (соотношение 1:1) при действии бихромата калия в абсолютных значениях (дес. тыс. кл/мл) и в % от общего количества клеток в культуре (ноябрь 2013 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.5	1	1.5
0	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$
2	$\frac{13.5 \pm 2.0}{57.9 \%}$	$\frac{6.3 \pm 0.3}{40.9 \%}$	$\frac{6.3 \pm 1.8}{52.0 \%}$	$\frac{3.2 \pm 0.4}{38.2 \%}$
4	$\frac{52.8 \pm 13.6}{57.6 \%}$	$\frac{21.5 \pm 5.8}{36.6 \%}$	$\frac{11.5 \pm 5.0}{34.2 \%}$	$\frac{6.2 \pm 2.6}{27.8 \%}$
7	$\frac{62.2 \pm 1.5}{33.9 \%}$	$\frac{53.5 \pm 2.9}{28.1 \%}$	$\frac{49.7 \pm 9.8}{29.5 \%}$	$\frac{19.2 \pm 3.4}{20.2 \%}$
10	$\frac{67.2 \pm 5.4}{22.2 \%}$	$\frac{51.0 \pm 7.8}{16.6 \%}$	$\frac{16.5 \pm 5.9}{7.3 \%}$	$\frac{6.5 \pm 1.0}{4.1 \%}$
14	$\frac{48.5 \pm 18.6}{12.2 \%}$	$\frac{27.5 \pm 12.7}{8.6 \%}$	$\frac{10.7 \pm 4.3}{3.9 \%}$	$\frac{6.8 \pm 1.2}{3.1 \%}$
18	$\frac{52.5 \pm 24.5}{9.8 \%}$	$\frac{43.8 \pm 15.2}{10.7 \%}$	$\frac{7.8 \pm 3.1}{34.2 \%}$	$\frac{4.0 \pm 2.0}{2.0 \%}$
25	$\frac{23.3 \pm 11.8}{4.8 \%}$	$\frac{26.2 \pm 12.7}{5.2 \%}$	$\frac{7.7 \pm 2.1}{3.2 \%}$	$\frac{1.8 \pm 0.5}{0.8 \%}$
32	$\frac{25.0 \pm 13.7}{4.2 \%}$	-	-	-

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 21. Численность клеток *Scenedesmus quadricauda* в смешанной с *Monoraphidium arcuatum* культуре (соотношение 1:1) при действии бихромата калия в абсолютных значениях (дес. тыс. кл/мл) и в % от общего количества клеток в культуре (ноябрь 2013 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	Контроль	0.5	1	1.5
0	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$	$\frac{2.5 \pm 0.2}{50 \%}$
2	$\frac{9.8 \pm 0.9}{42.1 \%}$	$\frac{9.2 \pm 0.6}{59.1 \%}$	$\frac{5.8 \pm 0.9}{48.0 \%}$	$\frac{5.2 \pm 1.2}{61.8 \%}$
4	$\frac{38.8 \pm 6.4}{42.4 \%}$	$\frac{37.2 \pm 5.7}{63.4 \%}$	$\frac{22.2 \pm 5.9}{65.8 \%}$	$\frac{16.0 \pm 4.5}{72.2 \%}$
7	$\frac{121.2 \pm 38.8}{66.1 \%}$	$\frac{137.2 \pm 8.5}{71.9 \%}$	$\frac{118.8 \pm 28.3}{70.5 \%}$	$\frac{76.0 \pm 13.2}{79.8 \%}$
10	$\frac{235.5 \pm 11.8}{77.8 \%}$	$\frac{256.5 \pm 32.8}{83.4 \%}$	$\frac{210.8 \pm 22.5}{92.7 \%}$	$\frac{151.0 \pm 20.1}{95.9 \%}$
14	$\frac{350.3 \pm 55.1}{87.8 \%}$	$\frac{294.0 \pm 3.9}{91.4 \%}$	$\frac{261.3 \pm 23.0}{96.1 \%}$	$\frac{208.5 \pm 37.1}{96.9 \%}$
18	$\frac{485.0 \pm 87.8}{90.2 \%}$	$\frac{363.8 \pm 89.2}{89.3 \%}$	$\frac{243.8 \pm 20.4}{96.9 \%}$	$\frac{194.7 \pm 27.2}{98.0 \%}$
25	$\frac{465.8 \pm 53.0}{95.2 \%}$	$\frac{482.5 \pm 91.5}{94.8 \%}$	$\frac{235.0 \pm 7.9}{96.8 \%}$	$\frac{233.0 \pm 2.0}{99.2 \%}$
32	$\frac{572.5 \pm 121.3}{95.8 \%}$	-	-	-

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 22. Численность клеток *Monoraphidium arcuatum* в смешанной со *Scenedesmus quadricauda* культуре (соотношение 9:1) при действии бихромата калия в абсолютных значениях (дес. тыс. кл/мл) и в % от общего количества клеток в культуре (ноябрь 2013 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	0	0.5	1	1.5
0	$\frac{4.5 \pm 0.2}{90 \%}$	$\frac{4.5 \pm 0.2}{90 \%}$	$\frac{4.5 \pm 0.2}{90 \%}$	$\frac{4.5 \pm 0.2}{90 \%}$
2	$\frac{26.7 \pm 9.7}{83.3 \%}$	$\frac{6.3 \pm 0.3}{40.9 \%}$	$\frac{6.3 \pm 1.8}{52.0 \%}$	$\frac{3.2 \pm 0.4}{38.2 \%}$
4	$\frac{52.8 \pm 13.6}{57.6 \%}$	$\frac{21.5 \pm 12.8}{36.6 \%}$	$\frac{11.5 \pm 5.0}{34.2 \%}$	$\frac{6.2 \pm 2.6}{27.8 \%}$
7	$\frac{56.2 \pm 12.0}{31.7 \%}$	$\frac{42.0 \pm 22.6}{23.4 \%}$	$\frac{49.7 \pm 9.8}{29.5 \%}$	$\frac{16.5 \pm 5.7}{17.8 \%}$
10	$\frac{89.7 \pm 12.1}{48.6 \%}$	$\frac{51.0 \pm 7.8}{16.6 \%}$	$\frac{16.5 \pm 5.9}{7.3 \%}$	$\frac{6.5 \pm 1.0}{4.1 \%}$
14	$\frac{38.3 \pm 22.6}{9.9 \%}$	$\frac{27.5 \pm 12.7}{8.6 \%}$	$\frac{10.7 \pm 4.3}{3.9 \%}$	$\frac{5.5 \pm 2.6}{2.6 \%}$
18	$\frac{52.5 \pm 24.5}{9.8 \%}$	$\frac{43.8 \pm 31.8}{10.7 \%}$	$\frac{7.8 \pm 3.1}{3.1 \%}$	$\frac{3.0 \pm 2.2}{1.5 \%}$
25	$\frac{72.0 \pm 9.1}{9.7 \%}$	$\frac{26.2 \pm 17.2}{5.2 \%}$	$\frac{7.7 \pm 2.1}{3.2 \%}$	$\frac{1.8 \pm 0.5}{0.8 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($td > 2.78$)

Таблица 23. Численность клеток *Scenedesmus quadricauda* в смешанной с *Monoraphidium arcuatum* культуре (соотношение 9 *M. arcuatum*: 1 *S. quadricauda*) при действии бихромата калия в абсолютных (дес. тыс. кл/мл) и в % от общего количества (ноябрь 2013 г.)

Время, сутки	Концентрации бихромата калия, мг/л			
	0	0.5	1	1.5
0	$\frac{0.5 \pm 0.1}{10 \%}$	$\frac{0.5 \pm 0.1}{10 \%}$	$\frac{0.5 \pm 0.1}{10 \%}$	$\frac{0.5 \pm 0.1}{10 \%}$
1	$\frac{5.3 \pm 3.5}{16.7 \%}$	$\frac{9.2 \pm 0.6}{59.1 \%}$	$\frac{5.8 \pm 0.9}{48.0 \%}$	$\frac{5.2 \pm 1.2}{61.8 \%}$
4	$\frac{38.8 \pm 6.4}{42.4 \%}$	$\frac{37.2 \pm 5.7}{63.4 \%}$	$\frac{22.2 \pm 5.9}{65.8 \%}$	$\frac{16.0 \pm 4.5}{72.2 \%}$
7	$\frac{121.2 \pm 38.8}{68.3 \%}$	$\frac{137.2 \pm 8.5}{76.6 \%}$	$\frac{118.8 \pm 28.3}{70.5 \%}$	$\frac{76.0 \pm 13.2}{82.2 \%}$
10	$\frac{95.0 \pm 3.1}{51.4 \%}$	$\frac{256.5 \pm 32.8}{83.4 \%}$	$\frac{210.8 \pm 22.5}{92.7 \%}$	$\frac{151.0 \pm 20.1}{95.9 \%}$
14	$\frac{350.3 \pm 55.1}{90.1 \%}$	$\frac{295.0 \pm 3.9}{91.4 \%}$	$\frac{261.3 \pm 23.1}{96.1 \%}$	$\frac{208.5 \pm 37.1}{97.4 \%}$
18	$\frac{485.0 \pm 107.8}{90.2 \%}$	$\frac{363.8 \pm 110.2}{89.3 \%}$	$\frac{243.8 \pm 20.4}{96.9 \%}$	$\frac{194.7 \pm 27.2}{98.5 \%}$
25	$\frac{544.8 \pm 98.1}{91.1 \%}$	$\frac{482.5 \pm 171.5}{94.8 \%}$	$\frac{235.0 \pm 7.9}{96.8 \%}$	$\frac{233.0 \pm 2.0}{99.2 \%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе - в процентах относительно контроля. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($t_d > 2.78$)

Таблица 24. Содержание живых клеток *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* (% от общего количества) в смешанных культурах с разным исходным соотношением численности (9:1 и 1:1)

Время, сутки	Исходное соотношение численности клеток <i>Monoraphidium arcuatum</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i>			
	9:1		1:1	
	<i>Monoraphidium arcuatum</i>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Monoraphidium arcuatum</i>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
0	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.5
2	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.5	99.0 ± 0.5
4	98.0 ± 0.7	98.0 ± 0.6	98.2 ± 0.5	98.0 ± 0.5
7	96.0 ± 1.2	98.0 ± 1.0	95.1 ± 1.0	97.0 ± 1.0
10	95.0 ± 3.0	98.0 ± 1.0	90.0 ± 3.0	95.0 ± 3.0
14	82.0 ± 11.0	97.0 ± 1.4	89.0 ± 3.0	96.0 ± 2.0
18	77.0 ± 11.3	96.0 ± 2.0	92.0 ± 4.0	97.0 ± 2.2
25	73.0 ± 13.0	94.0 ± 3.0	84.0 ± 10.0	95.0 ± 3.0
32	77.0 ± 8.0	93.0 ± 3.0	82.0 ± 7.0	94.0 ± 2.0

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Справка о депонировании культуры *Monoraphidium arcuatum* (Korsh.) Hind. В коллекции культур микроводорослей

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ (IPPAS)

127276, Москва, И-276, Ботаническая ул. 35, ИФР РАН
e-mail: maria.sinetova@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

СПРАВКА*

о депонировании штамма в коллекции микроводорослей
ИФР РАН (IPPAS)

Авторы изобретения:

Спиркина Наталья Евгеньевна, Дмитриева Аида Георгиевна, Коломенская
Евгения Евгеньевна, Ипатова Валентина Ивановна

Название изобретения: Культура одноклеточных водорослей *Monoraphidium arcuatum* (Korsh.) Hind. – рекомендуемый тест-объект для оценки качества природных и сточных вод

Заявители: МГУ имени М.В.Ломоносова, кафедра гидробиологии

Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ

Род, вид и назначение депонированного штамма: род - *Monoraphidium*,
вид - *M. arcuatum* (Korsch.) Hindák, 1970, назначение - тест-объект для оценки качества природных и сточных вод

Дата депонирования: «12» августа 2014 г.

Регистрационный номер, присвоенный депонированному штамму:

IPPAS M-2017

Зам. директора института,
д.б.н.

Руководитель коллекции,
к.б.н.



И.Е. Мошков

М. А. Синетова

(*) Справка прилагается к описанию изобретения на штамм, культуру микроводорослей, способ получения веществ биотехнологическим путем, вещество, полученное биотехнологическим путем и т.п. для патентной процедуры

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – Валентине Ивановне Ипатовой за грамотное руководство, доверие, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку. Олегу Федоровичу Филенко и Аиде Георгиевне Дмитриевой за терпение, за предоставленную возможность испробовать свои силы, содержательное обсуждение результатов и ценные рекомендации на всех этапах работы. Своему рецензенту – Людмиле Дмитриевне Гапочке – за конструктивную доброжелательную критику и за искреннее желание поделиться знаниями и опытом. Автор также глубоко признателен Л. В. Ильяш за ценную консультацию, Д. М. Гершкович и О. В. Воробьевой за искреннее сочувствие и готовность помочь, О. В. Штаер и Н. Ю. Днестровской за помощь в получении микрофотографий, А. Г. Тригубу за содействие при проведении экспериментов с коллоидным серебром, Е. Е. Коломенской за помощь на первых этапах работы и Е. А. Карбышевой за поддержку в процессе написания диссертации. От всей души благодарю сотрудников кафедры гидробиологии за отзывчивость и доброе отношение. Благодарю своих родителей, друзей и всех, кто был рядом эти годы. Спасибо, что верили, вдохновляли и поддерживали меня!