

ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

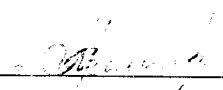
МАГИСТРАТУРА

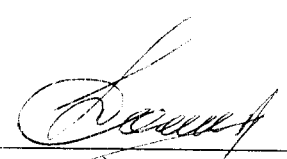
кафедра «Прикладная биотехнология»

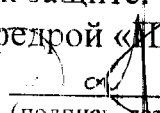
Магистерская диссертация

**ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ПРОСТЕЙШИХ ВОДОРОСЛЕЙ (CHLORELLA)**

6N0701 «Биотехнология»

Исполнитель  Рахимбекова А.Ж.
(подпись, дата)

Научный руководитель
Профессор  Камербаев А.Ю.
(подпись, дата)

Допущена к защите:
Зам.зав.кафедрой «ИБТ»
Профессор  Омаров М.С.
(подпись, дата)

Павлодар, 2006

РЕФЕРАТ

Объем данной магистерской диссертации составляет 63 страницы. Количество рисунков и графиков - 7, таблиц - 5, формул - 16, использованных источников - 74.

ОСНОВНАЯ ЦЕЛЬ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ - изучение биохимических и органолептических свойств простейших водорослей, а также исследование процессов накопления внеклеточных органических веществ в культурах хлорококковых водорослей в связи с физиологическим состоянием клеток. В связи с этим были сформулированы следующие задачи:

1. исследовать процессы накопления внеклеточных органических веществ в культурах хлорококковых водорослей в связи с фотосинтетической активностью и жизнеспособностью клеток;

2. установить возможности применения данных электроспектроскопии накопительной культуры *Chlorella* в процессе развития в оптимальных условиях для определения функциональной активности клеток водоросли;

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве основного объекта исследования использовали аксеничную культуру водоросли *Chlorella pyrenoidosa*, штамм DMMSU-S-39. Культуру выращивали накопительным методом на среде Тамия в культуральных сосудах с 250 мл среды при температуре 37⁰ С и непрерывном освещении 40 Вт/м лампами ЛБ-80. Сосуд барботировали воздухом, очищенным пропусканием через систему ватных фильтров и обогащенным 2% CO₂, скорость тока воздуха 0,3 л/мин. Водоросли периодически проверяли на чистоту высевом на чашки со стандартными агаровыми средами МПА 1Б° сусло.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Численность клеток определяли прямым счетом в камере Горяева, а также по оптической плотности при 540 нм на спектроэлектроколориметре с дальнейшим построением калибровочных кривых. Процент мертвых клеток учитывали подсчетом 500-1000 клеток путем окрашивания метиленовым синим. Ошибка не превышала 5-7 %. Количество общего ВОВ культуральных сред и биомассы клеток определяли после сжигания с бихроматом калия колориметрически на спектроэлектроколориметре. Для этого клетки отделяли от среды 15 мин. центрифугированием при 5500 g с последующим фильтрованием через мембранные фильтры с размерами пор 0,23 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Опыты по изучению накопления ВОВ в культурах водоросли *Chlorella pyrenoidosa* показали, что увеличение количества ВОВ происходило в соответствии с ростом численности клеток и к концу опыта составляло величину 580-620 мг/л. В начале, в частности на временном интервале 1-5 сут. содержание мертвых клеток не превышало 3-5%. Накопление

органики в среде в это время происходило с высокой скоростью. Можно допустить, что источником ее в это время являются живые клетки водорослей.

Наиболее важным является вопрос о возможностях клеток водорослей к прижизненному выделению органических веществ, что тесно связано с гетерогенностью структуры популяции клеток по физиологическому состоянию, с критериями определения живых и мертвых клеток. Оценка прироста ВОВ отношению к приросту биомассы для *Chlorella pyrenoidosa* S-39 в оптимальных условиях в начале кривой роста показала, что возможная величина прижизненных выделений ВОВ клетками культуры составляет 3,9-5,1% по отношению прироста ВОВ к приросту биомассы (табл.2).

Установлено, что, к 3-5 сут. развития достигается максимальная активность фотосинтеза, накопление в среде органики резко увеличено за счет прижизненных выделений, поскольку мертвых клеток мало (по окрашиванию). На 3 сут. процент живых клеток, определенный при помощи метода электроспектроскопии не являлся максимальным и уже составлял лишь около 75 % (табл. 4) , что означает наличие в суспензии клеток, функционально ослабленных, но не мертвых. В период 5-7 сут. (фаза экспоненциального роста) продолжается интенсивный рост численности клеток и накопление органики в среде. Количество мертвых клеток по методу окрашивания - около 9%. Активность фотосинтеза снизилась, но она достаточна для поддержания темпов роста культуры. По электрическим параметрам число живых уже существенно уменьшилось, очевидно, за счет уменьшения доли клеток, способных к активному транспорту и возрастания доли клеток, функционально менее активных, но с преобладанием роли пассивной проницаемости. Такие клетки в первую очередь гибнут, но на данный момент времени их нельзя считать мертвыми. Доля ВОВ, выделяемого клетками, с нарушенными барьерными свойствами мембран довольно высока и становится преобладающей к 10 сут., а к 14 сут. лишь 34% клеток можно считать функционально живыми, тогда как по методу окрашивания в культуре до 70% живых клеток (табл. 4).

Выявлено, что, рост и развитие клеток водорослей сопровождается изменением как активных, так и пассивных транспортных процессов через мембрану клеток, причем в определенные сутки культивирования активный перенос ионов преобладает над пассивной проницаемостью. Так происходит на 5-7 сут, тогда как на 3 и 11 сут уровень функционирования активных транспортных процессов минимален. Это свидетельствует об увеличении числа жизнеспособных клеток в культуре на 5-7 сут, что также подтверждается максимальными значениями в эти сроки коэффициента поляризации (жизнеспособности) K_p .

Опираясь на исследование функционального состояния культуры *Chlorella pyrenoidosa* S-39 можно полагать, что до 7 сут. развития в условиях 14-сут.

наблюдений в накоплении ВОВ определяющее значение имеют процессы прижизненного выделения, которое происходит почти линейно. После 7 сут. процесс накопления ВОВ продолжается, причем с ускорением, очевидно за счет вклада в накопление биомассы лизировавшихся клеток, а также органики, выделяющейся функционально мертвыми клетками с мембранами, утратившими свои барьерные функции (рис.3). Изменения активности фотосинтеза и энергозависимых параметров в это время имели сходный характер с максимумом на 5 сут. (изменения активности ФС 2, величины R_s , отражающего проницаемость и α - параметра, зависящего от уровня метаболизма клеток), что подтверждает высказанное выше положение.

Основное значение водорослей в жизни природы вытекает из их физиологических особенностей как зелёных растений: подобно высшим зелёным растениям на суше, водоросли в воде являются основным созидателем органического вещества. Таким образом, можно сказать, что весь остальной мир современных живых существ воды в той или иной мере обязан своим существованием водорослям, так как водоросли, благодаря содержанию в них хлорофилла, способны созидать органические вещества своего тела из неорганических веществ окружающей их воды. Следовательно, они являются в воде производителями той первопищи, которой в дальнейшем пользуются все остальные лишённые хлорофилла водные организмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Огромное значение имеет также то обстоятельство, что водоросли в процессе фотосинтеза выделяют свободный кислород, необходимый для дыхания водных организмов, как животных, так и растительных.

В работе рассматривали водоросли как морфофизиологическую целостность, выяснили их многообразие в целом, происхождения и взаимных филогенетических связей, изучили биохимические и органолептические свойства водорослей (на примере *Chlorella*). Точно так же с этих позиций целостности хорошо выявляются место и роль водорослей в природе: в историческом плане они представляют собой первый этап в развитии всего зелёного ствола растительного мира, а в общем круговороте веществ в природе играют огромную роль как первичное звено всех пищевых связей в водной среде и гигантский поставщик кислорода в атмосферу. Несмотря на удивительное многообразие жизненных форм растений, большинство из них объединяет уникальная способность, которая определяется способом их питания.

Проведенные в работе исследования показали, что в процессе развития накопительной культуры *Chlorella* выделение органических веществ на разных стадиях роста происходит неравномерно и тесно связано с функциональным состоянием клеток, соотношением процессов прижизненного и постдетального выделения. В связи с неоднородностью структуры популяции водоросли по функциональному состоянию, трудно учесть внеклеточные органические вещества (ВОВ) водорослей, выделяемое

клетками живыми, но с нарушенной проницаемостью внешних мембран, в накоплении внеклеточных органических веществ водорослей возрастает роль пассивной диффузии органических веществ. Накопление их в культуральной среде водорослей сопровождалось значительными изменениями фотосинтетической активности культуры *Chlorella pyrenoidosa* S-39. В экспоненциальной фазе максимальная фотосинтетическая активность культуры водоросли, величина коэффициента поляризации, отражающего проницаемость и зависящего от уровня метаболизма клеток, совпадала со скоростью роста и скоростью накопления ВОВ. Накопление ВОВ на фоне снижения фотосинтетической активности и в начале стационарной фазы развития культуры, объясняется увеличением доли клеток с низкой функциональной активностью - функционально мертвых (по электрической проводимости на низких частотах.). В это время в процессе выделения ВОВ увеличивается роль пассивной диффузии в связи с увеличением проницаемости мембран клеток, судя по электропроводности. На стационарной фазе резко снижается жизнеспособность клеток водоросли и в составе ВОВ значительно возрастает доля продуктов автолиза клеток. Доля мертвых клеток по данным электропроводности выше, чем по методу окрашивания для всей кривой роста. Это свидетельствует в пользу сложного характера гетерогенности структуры популяции водоросли *Chlorella* по функциональному состоянию. В накоплении ВОВ увеличивается роль выделений функционально мертвыми клетками (по низкочастотной проводимости). Следовательно, при учете ВОВ необходимо принимать во внимание функциональное состояние клеток, что позволит точнее оценивать внеклеточную продукцию водорослей, а также регулировать биотехнологические циклы с использованием культур микроводорослей.

Полученные в работе данные позволяют полагать, что в естественных условиях накопление внеклеточных органических веществ, нередко обладающих высокой биологической активностью, создает возможности как для их использования в энергетическом обмене микроорганизмов и водорослей, так и для участия ВОВ в регуляции развития самих водорослей.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	5
2. Обзор литературы	12
2.1. Внеклеточные органические вещества водорослей - общие положения	12
2.2. Химическая природа внеклеточных органических веществ	13
2.3. Процессы выделения клетками водорослей органических веществ	16
2.4. Биохимическая характеристика водоросли <i>Chlorella</i>	18
2.5. Электроспектроскопия в оценке функционального состояния клеток и культур микроводорослей	19
2.6. Флуоресценция хлорофилла и ее использование для определения функционального состояния водорослей	26
2.7. Физиологическая и антибактериальная активность внеклеточных метаболитов микроводорослей.	28
2.8. Активность внеклеточных метаболитов водорослей по отношению к водорослям - их продуцентам	30
3. Объекты и методы исследования , технология производства и получения суспензии <i>Chlorella</i>	32
3.1. Объекты исследования	32
3.2. Методы исследования	33
3.3. Технология производства и получения суспензии <i>Chlorella</i>	39
4. Результаты и обсуждение	39
4.1. Накопление внеклеточных органических веществ в культуре микроводорослей	39
4.2. Состояние культуры водоросли <i>Chlorella</i> по результатам электроспектроскопии и процессы выделения внеклеточных органических веществ	41
5. Заключение	53
6. Список использованных источников	58

1. ВВЕДЕНИЕ

Мир водорослей огромен. Он занимает в растительном царстве совершенно особое, исключительное по своему значению место, как в историческом аспекте, так и по той роли, которая принадлежит ему в общем круговороте веществ в природе. Вместе с тем само понятие "водоросли" в научном отношении страдает большой неопределённостью. Это заставляет специально рассмотреть отличие относимых сюда растительных организмов от других представителей растительного царства.

Действительно, слово «водоросли» означает лишь то, что это растения, живущие в воде. Однако в ботанике этот термин применяется в более узком смысле, и не все растения, наблюдаемые нами в водоёмах, можно назвать водорослями. С другой стороны, именно водоросли мы часто попросту не замечаем в водоёмах, так как очень многие из них нелегко распознать невооружённым глазом.

Приглядываясь к различным водоёмам, особенно к озёрам, мы прежде всего замечаем обилие растений. Некоторые из них прикреплены ко дну. К ним относятся, например, крупные зелёные скопления так называемой тины. Здесь же нередко встречаются и более крупные водоросли, состоящие из хорошо заметных на глаз простых или ветвящихся нитей, или совсем крупные хоровые водоросли, внешне похожие на хвощ.

С другой стороны, значительное количество микроскопических водорослей, таких же как в водоёмах, произрастает и на суше: на поверхности почвы и в самой её толще, на деревьях, камнях. Правда, жизнь этих водорослей тоже тесно связана с водой, однако они могут довольствоваться только атмосферной и грунтовой влагой, росой. В отличие от "водных" водорослей, эти водоросли легко переносят высыхание и очень быстро оживают при малейшем увлажнении. В царстве растений водоросли относятся к обширному подцарству низших, или слоевцовых растений, куда входят также бактерии, грибы и лишайники. Как и все низшие растения, водоросли размножаются вегетативно или с помощью спор, то есть относятся к споровым растениям. Однако в физиологическом отношении водоросли резко отличаются от остальных низших растений наличием хлорофилла, благодаря которому они способны ассимилировать на свету углекислый газ. Кроме того, многие водоросли, обладающие хорошо развитым хлорофиллом, помимо фототрофного, могут быть свойственны и другие типы питания.

Таким образом, исходя из сказанного, легко вывести точное научное определение водорослей. **Водоросли** — это низшие, то есть слоевцовые споровые растения, содержащие в своих клетках хлорофилл, и живущие преимущественно в воде. Такое определение, однако, не даёт представление о том огромном разнообразии в строении тела, которое свойственно

водорослям. Здесь мы встречаемся и с микроскопическими организмами – одноклеточными и многоклеточными, и с крупными формами различного строения. Большого разнообразия достигают здесь способы размножения и строение органов размножения. Даже по окраске водоросли неодинаковы, так как одни содержат только хлорофилл, другие ещё ряд дополнительных пигментов, окрашивающие их в различные цвета.

В научной литературе до сих пор продолжаются споры о положении в общей системе, с одной стороны, сине – зелёных водорослей и, с другой стороны, всех тех водорослей, которые представлены одноклеточными подвижными формами, снабжёнными органами движения – жгутиками (это почти все эвгленовые водоросли, большая часть пиррофитовых и золотистых водорослей и отдельные классы жёлто – зелёных и зелёных водорослей). Действительно, сине – зелёные резко отличаются от других водорослей простотой внутренней организации клеток. Их клетки лишены оформленного ядра, что сближает их с бактериями. Вместе с бактериями сине – зелёные водоросли составляют раздел организмов, обозначенный как прокариоты, то есть "ядерные", в отличие от всех остальных растений и животных, обладающих оформленным клеточным ядром и обозначаемых как эукариоты. Что же касается жгутиковых форм водорослей, то здесь вопрос осложняется тем, что они во многих случаях близки к подобным же бесцветным формам, что дало повод для объединения всех их в общую систематическую группу "жгутиковых организмов" и включение в систему животного мира.

С этих позиций мир водорослей как первичных фототрофных организмов един и целостен. Морфологическое многообразие его различных ветвей есть следствие эволюционного взрыва, вызванного появлением фотосинтеза, который обеспечил хлорофиллоносным организмам успешное развитие в чисто абиотической среде. Учитывая особенности строения клеток сине – зелёных водорослей, следует думать, что возникновение хлорофилла произошло ещё на прокариотическом уровне, а наличие в настоящее время сходных хлорофиллоносных и бесцветных эукариотических жгутиковых форм обусловлено морфологическим параллелизмом эволюционного развития в разных ветвях организмов. Во всяком случае, у водорослей подобное явление морфологического параллелизма распространено очень широко. Такая точка зрения хорошо подтверждается ещё и тем, что в пределах большинства вышеперечисленных отделов водорослей жгутиковые формы тесно связаны переходами с другими, типично "водорослевыми" структурами – неподвижными клетками, колониями и нитями. С другой стороны в пределах некоторых отделов имеются и безусловно вторичные обесцветившиеся формы.

Таким образом, рассмотрим водоросли как морфофизиологическую целостность, выясним их многообразие в целом, происхождения и взаимных филогенетических связей. Точно так же с этих позиций целостности хорошо

выявляются место и роль водорослей в природе: в историческом плане они представляют собой первый этап в развитии всего зелёного ствола растительного мира, а в общем круговороте веществ в природе играют огромную роль как первичное звено всех пищевых связей в водной среде и гигантский поставщик кислорода в атмосферу.

Изучение всех этих вопросов составляет предмет особой науки – **альгологии**.

Несмотря на удивительное многообразие жизненных форм растений, большинство из них объединяет уникальная способность, которая определяется способом их питания.

В отличие от животных организмов и многих бактерий, использующих для своей жизнедеятельности готовые органические соединения, у растений выработалась в ходе эволюции способность использовать для питания такие полностью окислённые вещества, как углекислота и вода, и создавать на их основе органические соединения. Этот процесс в природе осуществляется за счёт энергии солнечного света и сопровождается выделением кислорода. Использование световой энергии для биологических синтезов стало возможным благодаря появлению у растений комплекса поглощающих свет пигментов, важнейшим из которых является хлорофилл. Процесс светового и углеродного питания растений получил название фотосинтеза. Таким образом, функция фотосинтеза растений является, по существу, биохимическим процессом преобразования световой энергии в химическую.

Водоросли, уже простейшие из них – сине – зелёные, являются первыми организмами, у которых появилась в процессе эволюции способность осуществлять фотосинтез с использованием воды в качестве источника водорода и выделением свободного кислорода, то есть процесс, свойственный всем другим водорослям, а за ними и высшим растениям.

Осуществляемый растениями в грандиозном масштабе процесс преобразования энергии света в химическую энергию продуктов фотосинтеза является практически единственным "руслom", через которое "вливается" в биологически приемлемой форме энергия, необходимая для поддержания жизни и круговорота веществ в биосфере нашей планеты. Именно поэтому выдающийся русский естествоиспытатель К.А. Тимирязев говорил о «космической роли зелёных растений». О размерах фотосинтетической деятельности растений в планетарном масштабе можно судить по тому, что весь кислород атмосферы Земли имеет, как сейчас доказано, фотосинтетическое происхождение. Залежи каменного угля представляют собой своеобразный "запас" некогда преобразованной в результате фотосинтеза растений солнечной энергии, складированный в определённые геологические эпохи.

Второй особенностью питания водорослей и других растений, не менее важной, хотя и не такой специфичной, как фотосинтез, является их способность усваивать азот, серу фосфор, калий и другие минеральные

элементы в виде ионов минеральных солей и использовать их для синтеза таких важнейших компонентов живой клетки, как аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, макроэргические соединения, вещества вторичного обмена. Среди сине – зелёных водорослей имеются формы, способные осуществлять процесс фиксации свободного азота атмосферы и превращать его в органические азотные вещества своего тела.

Основными первичными продуцентами в водоемах являются планктонные водоросли, которые за счет фотосинтеза осуществляют процесс новообразования органического вещества. Органические вещества клеток водорослей и органические вещества, выделяемые ими в среду - основа функционирования трофической цепи и, следовательно, трансформации вещества и энергии в водных экосистемах. Внеклеточные органические вещества (ВОВ) являются связующим звеном в трофической цепи между водорослями, бактериями, зоопланктоном, а также внутри сообщества фитопланктона. Выделение органических веществ водорослями во внешнюю среду - естественный процесс, отражающий жизнедеятельность клеток водорослей. Разнообразие состава ВОВ, биологическая активность отдельных компонентов позволили выдвинуть гипотезу об активном участии внеклеточных продуктов в экологическом метаболизме водоемов [51,58].

Изучение взаимодействия водорослей и бактерий с участием внеклеточных метаболитов, в частности, антагонизма, важно для понимания механизмов взаимной регуляции популяций клеток в альгобактериальных ассоциациях, что существенно для прогнозирования изменений в сообществе и поиска путей управления этим взаимодействием и представляет интерес как для теоретических вопросов гидробиологии, так и для практических задач биотехнологии.

В настоящее время достаточно хорошо изучен химический состав ВОВ микроводорослей, в основном с использованием лабораторных культур [19,32]. Однако до сих пор существуют противоречия в оценке возможных объемов прижизненных выделений, что чрезвычайно важно для правильной оценки первичной продукции [1,47]. Одним из наименее изученных является вопрос о механизмах выделения ВОВ, собственно определяющий происхождение ВОВ и процессы их накопления во внешней среде микроводорослей. Дело осложняется трудностями методического характера, а также неоднородностью популяций клеток водорослей по физиологическому состоянию, что присуще природным популяциям и накопительным культурам. В результате сложно определить, какая доля ВОВ является результатом прижизненных выделений, а какая образовалась в процессе размножения клеток или их автолиза. Такое положение является следствием отсутствия данных по изучению процессов накопления ВОВ в связи с функциональным состоянием культур и клеток микроскопических водорослей, определяемых в основном активностью фотосинтеза и барьерными свойствами внешних мембран.

Наличие в составе ВОВ физиологически активных соединений липидной, фенольной природы и продуктов их ферментативной или неферментативной трансформации позволяет полагать их участие в формировании качества водной среды как среды обитания, а также в регуляции роста и развития водорослей [38,58] и микроорганизмов. Несмотря на длительную историю исследования ВОВ микроскопических водорослей, на современном этапе наименее изученными являются вопросы, связанные с процессами прижизненного выделения ВОВ, физиологической активности отдельных компонентов внеклеточных продуктов и участия их в регуляции роста и развития водорослей.

Представитель многочисленного семейства микроскопических водных растений, из зеленых водорослей - *Chlorella*. Скорее всего, сравнивая с другими видами, ее можно отнести к культурным растениям, которые быстро приспособились к условиям аквакультуры. В царстве растений, *Chlorella* стоит на первом месте по очень многим показателям. Так, например, химический состав клетки по содержанию белков, незаменимых аминокислот, витаминов, набору микроэлементов, биологически активным веществам и прочим показателям не могут сравниться не только водные, но и наземные растения.

Chlorella была открыта и классифицирована в 1890 г. датским ученым М.У. Бейжерником. Свое название хлорелла получила благодаря греческому корню “**chloros**”, что значит желто-зеленый, а латинское окончание *-ella* – буквально означает “маленький”. Ее среда обитания - пресноводные водоемы, где эта микроскопическая водоросль, обладающая большим запасом хлорофилла и комплексом редчайших питательных веществ, участвует в процессе фотосинтеза, поглощая углекислый газ, насыщая воздух кислородом.

Эта микроскопическая водоросль считается долгожительницей нашей планеты, ее существование измеряется более чем двумя миллиардами лет, считается, что этим фактом она обязана уникальной клеточной структуре.

Сверхпрочные стенки клетки *Chlorella* содержат три уровня, защищая, таким образом, клеточное ядро от воздействий внешних неблагоприятных факторов. Средняя часть оболочки - самая крупная, она состоит из целлюлозы, а наружная, представляющая собой полимерный каротиноид, способна абсорбировать токсические элементы и удалять их из организма.

Очень распространенной является *Chlorella vulgaris*, а также *Chlorella pyrenoidosa* постоянно встречающаяся массами в воде и в грязи луж, канав и прудов. Часто развивается она, а также и родственная ей форма, *Chlorella infusionum* в лабораториях и домашнем быту в сосудах с водой или с растворами пепсина и сахара, покрывая нежным зеленоватым налетом внутреннюю поверхность стекла. Некоторые хлореллы известны уже с давних времен своим симбиозом с животными и первоначально принимались за органы последних, но еще Брандт и GezaEntz, независимо друг от друга, впервые признали за ними эндогенное происхождение,

показав, что зеленые шарообразные тельца, наблюдаемые в теле некоторых животных, суть самостоятельные организмы, при чем Брандт отнес эти тельца к особому роду водорослей, назвав его *Zoochlorella*. Но как свободноживущие хлореллы, так и зоохлореллы различных животных имеют совершенно одну и ту же организацию, проходят совершенно одинаковые стадии развития и отличаются только образом жизни, а потому Бейжерник и соединил их в один общий род *Chlorella*, тем более что единственный отличительный признак зоохлорелл от хлорелл, а именно только что упомянутый симбиотический образ жизни первых с некоторыми низшими животными, оказывается непостоянным признаком, так как Брандт, а за ним и позднейшие ученые, Кесслер, Гаманн, Шевяков, Фаминцын, Бейжерник и Аверинцев, доказали, что изолированные зоохлореллы могут существовать на свободе и при том также энергично размножаться, как и в теле животных. Организация и цикл развития хлорелл состоят в следующем: вегетативное тело их состоит из одной шарообразной или овальной клетки с тонкою оболочкою, которая по мнению одних авторов (Brandt, Dangeard) состоит из целлюлозы, а по мнению других (Geza-Entz, Фаминцын, Аверинцев и др.) из прозрачного студенистого вещества, лишенного целлюлозы. Такое разногласие во мнениях произошло в силу того, что иногда оболочка хлореллы не дает типичного для целлюлозы фиолетового окрашивания от хлорцинкиода, а потому вопрос этот остается пока открытым. Размеры шарообразных вегетативных клеток колеблются по данным различных авторов от 0,0015 мм. до 0,012 мм. В каждой такой клетке находится гомогенная протоплазма, очень маленькое ядро прекрасно окрашивающееся гематоксилином, и лентовидный или округлый пластинчатый стенкоположный хроматофор с одним или, реже, с двумя переноидами. Геца-Энц (Geza-Entz) описывал в клетках хлореллы еще особые сократительные вакуоли, подобно таковым у хламидомонад, но позднейшими исследователями эти показания Геца-Энца были опровергнуты. Размножение хлореллы происходит путем повторного деления сначала хроматофора и пиреноида, а затем и всего содержимого каждой клетки на несколько равных частей, от 2 до 16, которые остаются некоторое время окруженными материнскою оболочкою, а после разрыва и исчезновения ее, оказываются свободно лежащими, быстро увеличиваются в размерах и чрез некоторый промежуток времени повторяют тот же цикл развития. Подвижных элементов размножения у хлорелл не существует, подобно тому, как и у других *Pleurococcaceae*. Отступления от нормального цикла развития встречаются у хлорелл довольно редко и состоят в том, что иногда они размножаются путем отшнуровывания молодых особей от материнской, а кроме того при нормальном делении могут не освобождаться из материнской оболочки, а оставаться в ней на продолжительное время, превращаясь постепенно в стадии *Gloecystis* и *Palmella*. Бейжерник изучил питание хлореллы и нашел, между прочим, что они для добычи

необходимого азота нуждаются не только в пептоне, но и в каком-нибудь углеводе, как например сахар, а потому он причислил их к установленной им физиологической группе пентон-углеводных организмов. Сожительство хлореллы с животными представляет собою типичный пример того биологического явления, которое давно уже получило в Германии название *Raumparasitismus*, т. е. хлорелла не паразитирует в теле животного, но и не приносит ему пользы, а является, так сказать, даровым жильцом. Неоднократно было замечено, что не все экземпляры хлореллы остаются в теле простейших живыми, но иногда перевариваются последними. Явление это различно толковалось авторами, и только впоследствии удалось выяснить следующие условия, при которых хлореллы либо погибают в организме животных, особенно простейших, либо остаются жить в них: у простейших можно легко различить три слоя протоплазмы в каждой особи: наружную, альвеолярную плазму, служащую покровом для двух последующих слоев, среднюю, кортикальную плазму, не участвующую в пищеварении, и внутреннюю эндоплазму, заведующую пищеварением организма. Если хлорелла попадает в эндоплазму, то она переваривается животным, если же она попадет в кортикальный слой плазмы, то она остается жить в симбиозе с животным, так как этот слой плазмы не принимает участие в пищеварении. В систематическом отношении род *Chlorella* делится на несколько видов: *Chlorella vulgaris* Beyerink, *Chlorella infusionum* Beyerink, *Chlorella parasitica* Brandt, *Chlorella condustrix* Brandt, *Chlorella actinosphaerii* Averinzew, которые различаются между собою по размерам и форме хроматофоров и клеток, а также по другим мелким признакам. В качестве симбионтов они найдены у весьма многих Protozoa, а также и у полипов, как например у *Hydra viridis*.

В ходе микробиологических исследований в дрожжевую культуру вводились смертельные дозы токсических элементов, а затем добавлялась хлорелла. Так как благодаря воздействию хлореллы дрожжевая культура не погибла, было установлено, что эта микроскопическая водоросль в наиболее высокой степени способна нейтрализовать действия ядовитых веществ.

Главные преимущества хлореллы для здоровья:

1. Избыток хлорофилла
2. Природа клеточных стенок хлореллы
3. Наличие бета-каротина
4. Высокая концентрация нуклеиновых кислот.

Состав микроскопической водоросли *Chlorella* не исчерпывается высоким содержанием белка, витаминов, микроэлементов, также там присутствуют пигменты, без которых живые организмы не могут синтезировать ферменты, необходимые для нормального обмена веществ. Наиболее очевидный пигмент - хлорофилл, который называют "зеленым золотом" за идентичность его молекулярной структуры молекуле гемоглобина.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Внеклеточные органические вещества водорослей - общие положения

К низшим растениям относятся водоросли, грибы, лишайники, миксомицеты, или слизевики, бактерии и актиномицеты. В систематическом отношении низшие растения делят более чем на 10 обособленных отделов, каждый из которых имеет самостоятельное происхождение и свой ход эволюции (филогенез).

Наука о *систематике* (классификации) *растений* изучает группы растений, выделенные по общим (сходным) признакам. Группы называют *таксонами*. Самая мелкая их категория - *вид*, объединяющий сходные по строению, обитанию и жизнедеятельности особи, дающие потомство, похожее на родителей. Близкие по строению виды объединяют в *роды*. Близкие роды входят в состав одного *семейства*. Каждое семейство относят к определенному *классу* растений. Классы объединяются в *отделы*. Все отделы растений составляют единое *царство* растений.

Среди ВОВ могут оказаться продукты основного, промежуточного и вторичного метаболизма растительных клеток, поэтому в тексте редко используется термин растворенное органическое вещество (РОВ), по которому к РОВ относят растворенную органику с молекулярной массой 1 кДа, коллоиды 10 кДа и тонкодисперсные частицы до 0,45 мкм. Выделение ВОВ водорослями во внешнюю среду - естественный процесс, отражающий жизнедеятельность клеток водорослей. Разнообразие состава ВОВ, биологическая активность его компонентов уже давно позволили предположить активное участие ВОВ в экологическом метаболизме водоёмов [9,24]

При исследовании внеклеточных продуктов микроводорослей выделяют ряд задач: определение их количества, качественного состава, изучение механизмов выделения экзометаболитов во внешнюю среду, определение их биологической активности [19]. По количественной стороне ВОВ данные различных авторов наиболее противоречивы. Одни авторы считают, например, что ВОВ водорослей могут достигать величин, сопоставимых с биомассой клеток [61], другие допускают объем ВОВ 10-45% от общего ассимилированного углерода [41], или 10-30% [51], или даже 50-80% [2]. В культурах водорослей объёмы ВОВ ниже, чем в естественных водоёмах [2] и оцениваются в 2-10% от ассимилированного в процессе фотосинтеза углерода [18]. Одной из причин различных оценок количества ВОВ может быть различия в методах определения ВОВ [8,19].

Другая причина заключается в трудностях разделения истинно прижизненных внеклеточных ВОВ от тех, что оказываются во внешней среде в результате отмирания клеток [27]. ВОВ постлетального происхождения

оцениваются и в 75% от биомассы клеток. По другим данным, отмирание клеток водорослей не является определяющим в накоплении ВОВ в среде, а основным их источником являются прижизненные выделения [30]. Накопление ВОВ в культурах нитчатых водорослей до концентраций 40-100 мг/л относят целиком к прижизненным выделениям. Возможной причиной различной оценки количества ВОВ могут быть условия, при которых проводились исследования. Известно, что в олиготрофных водоёмах внеклеточные выделения выше (до 24% от общего ассимилированного углерода), чем в эвтрофных (до 12%), [46,2] увеличиваются они и в условиях несбалансированного роста и воздействии стрессовых факторов [33,30]. Выделение вновь синтезированных органических веществ зависят от состава фитопланктона, интенсивности фотосинтеза [66]. Продуцирование ВОВ зависит от размера клеток фитопланктона: мелкие формы продуцируют большие объёмы по сравнению с крупными [69]. При снижении уровня освещённости величина внеклеточной продукции увеличивается [46]

Органические вещества, выделяемые клетками водорослей во внешнюю среду - часть фотосинтетической продукции, лежащей в основе функционирования трофической цепи. В естественных условиях накопление ВОВ, нередко обладающих высокой биологической активностью, создает возможности как для их использования в энергетическом обмене микроорганизмов и водорослей, так и для участия в регуляции развития микроорганизмов и самих водорослей. Внеклеточным продуктам принадлежит важная роль в функционировании водных биоценозов и формировании определенных химических свойств водной среды как среды обитания [32]. Особый интерес к роли ЖК в функционировании водных экосистем определяется тем, что установлена связь между количеством ЖК в составе ВОВ фитопланктона и его численностью [57,58]. Показано, что состав СЖК поверхностного слоя воды может отражать фазы сезонной сукцессии фитопланктона [55]

2.2. Химическая природа внеклеточных органических веществ

Химическая природа выделяемых водорослями органических соединений, крайне разнообразна. Среди них встречаются углеводы, азотсодержащие вещества, органические кислоты, фенольные соединения, липиды, витамины, фитогормоны [19,34,35,32].

Растворимые полисахариды обнаруживаются в составе внеклеточных продуктов всех хорошо изученных одноклеточных зелёных водорослей *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* [19]. В отличие от высших растений целиком и полностью характеризующихся одним листостебельным типом строения, водоросли в пределах слоевцового типа строения обнаруживают исключительное морфологическое разнообразие. Тело водорослей, может быть всех четырех степеней

сложности, вообще известных для организмов – одноклеточным, колониальным, многоклеточным и неклеточным. Их размеры в пределах каждой из этих форм отличаются огромным диапазоном – от микроскопических, до очень крупных. Так некоторые виды зеленой одноклеточной водоросли синехотистис едва достигают 1 мкм, одноклеточные зелёные водоросли из рода *Chlorella*, могут быть в 2 мкм, а длина клеток, часто составляет 15 – 20 см. У водоросли *Chlorella*, внеклеточные полисахариды составляют 25-40% от общего количества органики в среде, основными среди них являются галактоза и арабиноза, в меньших количествах встречается фруктоза, манноза, рамноза, уроновые кислоты [62]. У *Chlorella* найдены также глюкоза, галактоза, ксилоза, арабиноза, при этом различия внеклеточных полисахаридов связаны с молярным соотношением входящих в ее состав моносахаридов и наличием или отсутствием уроновых кислот. Простые углеводы у большинства водорослей в средах либо совсем не обнаруживаются, либо присутствуют в следовых количествах [18]. Однако у цианобактерий *Anacystis nidulans* и *Synechocystis aquatilis* простые углеводы в средах составляют 9-13% от общего содержания ВОВ. Скорее всего, углеводы в культуральных средах являются компонентами клеточных стенок и накапливаются при лизисе, сращивании, растворении в процессе разложения [51,68,19].

У азотфиксирующей *Anabena cylindrica* на долю внеклеточного азота приходилось 30% от связанного. Среди внеклеточных азотсодержащих веществ, как правило, присутствуют белки и полипептиды. Во внеклеточных белках 23 видов морских водорослей содержалось от 0,2 до 5,9% от суммарного выделенного углерода. Потери связанного азота у зеленых водорослей меньше, у культуры *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella pyrenoidosa* на долю внеклеточного азота приходится 5-12% от общего азота среды и клеток. При этом 10-20% внеклеточного азота составляли полипептиды и 4-9% - свободные аминокислоты [20,16].

Среди органических кислот ВОВ особое место занимает гликолевая кислота. Выделение гликолата водорослями происходит в результате простой диффузии и определяется соотношением скоростей ее синтеза и потребления, связанного с активностью ферментов синтеза и ферментов гликолатного пути, в частности, гликолатдегидрогеназы [21,59].

Для микроводоросли рода *Chlorella*, характерно выделение в среду муравьиной и уксусной кислот (3-8%, иногда до 20% от суммы внеклеточных соединений). В культуральных средах этих же водорослей обнаруживали малат, оксалат, лактат, щавелевую, пировиноградную кислоты [19]. Установлено, что в культуральных средах *Scenedesmus acuminatus*, *Anabaena variabilis*, *Mycrocystis aeruginosa* максимальное количество органических кислот накапливается в лаг-фазе и начале экспоненциальной фазы роста. При этом обнаруживали лимонную, фумаровую, гликолевую, винную, янтарную кислоты [42].

Фенольные соединения в составе ВОВ водорослей представлены в виде полифенолов, таких как флавоноиды и танины у бурых водорослей, например у *Fucus vesiculosus* [67]. Для цианобактерий *Mycrocystis pulverea*, *Anabaena variabilis* показано, что фенольные соединения, выделяемые в культуральную среду, достигают концентраций 0,48-3,46 мг/л, причем количество выделяемых фенолов не связано с их внутриклеточным содержанием, а зависит от физиологического состояния. В культуральной среде зеленой водоросли *Chlorella* выявлены фенольные соединения флавоноидной природы, которые накапливались в количестве 0,61-1,04% от общего количества органического вещества среды в зависимости от стадии развития культуры и условий выращивания. Автору удалось идентифицировать в клетках вещества, хроматографически близкие к гликозиду флавонола, гликозиду изофлавона, гликозиду кверцетина. После кислотного гидролиза водорастворимых фенолов были обнаружены также фенолкарбоновые кислоты и сложные эфиры. Однако в средах в основном присутствовали продукты превращений фенольных соединений клеток [37,38]. Состав фенольных соединений в культуральных средах зеленых водорослей и цианобактерий близок по своему составу. Продуцирование фенолов отмечалось в природных условиях: цианобактерии, вызывающие "цветение" воды, выделяют фенольные соединения в процессе своей жизнедеятельности и при отмирании, что ухудшает качество воды и вызывает ингибирование роста у сопутствующей альгофлоры. [32,39]

Липиды в составе ВОВ водорослей составляют 8-10% от сухого вещества клеток [48]. Среди липидов, выделяемых различными группами водорослей, находят нейтральные липиды, стерины, эфиры стерinov, сульфолипиды, гликолипиды, фосфолипиды, триглицериды, свободные жирные кислоты (СЖК). При этом количество ненасыщенных жирных кислот (НЖК) составляет до 60% от общего количества СЖК и положительно коррелирует с морфологической сложностью водорослей. Суммарное содержание липидов и соотношение в них отдельных компонентов, состав ЖК зависят от видовых особенностей, температуры, обеспеченности биогенными элементами [32].

Зелёные водоросли, как это было показано на культуре *Chlorella*, в экспоненциальной и стационарной фазе роста накапливают в среде стерины, триглицериды, фосфолипиды и СЖК. Из ЖК идентифицированы миристиновая, пальмитиновая, олеиновая, эруковая, линолевая кислоты. Среди фосфолипидов - кефалин и лецитин [40]. Близкие данные были получены на культурах водоросли *Chlorella pyrenoidosa* шт.82 и *Chlorella* sp. штамм К. В культуральных средах обеих штаммов был обнаружен близкий состав ЖК. В наибольших количествах в среде находились пальмитиновая (16:0) и олеиновая (18:1) кислоты, содержание которых достигало 55 и 43 % соответственно от суммы ЖК. В значительно меньших количествах присутствовали пальмитолеиновая (16:1) и стеариновая (18:0) кислоты, в следовых - миристиновая (14:1), пентодекановая (15:0), линолевая (18:2),

линоленовая (18:3) и арахидовая (20:0). Суммарные концентрации ЖК в средах были определены как 1-10 мкМ, что составляло 0,1-0,4% от суммы органических веществ среды [36]. В липидах зелёных водорослей родов *Chlorella*, *Scenedesmus* преобладающими ЖК можно считать олеиновую, линолевую, линоленовую, пальмитиновую и пальмитолеиновую кислоты. В культуральной среде цианобактерии *Spirulina platensis* преобладали следующие СЖК: пальмитиновая (16:0), стеариновая (18:0), гексадеценовая (16:1), олеиновая (18:1). Достаточно большим было и содержание лауриновой (12:0) и миристиновой (14:0) кислот. Среди ЖК липидов водорослей преобладали пальмитиновая, линоленовая, линолевая, олеиновая, с ростом культуры происходило постепенное увеличение содержания НЖК [11].

Ранее было установлено, что в культуральных средах цианобактерии, зелёных, диатомовых водорослей, содержатся ЖК, присущие клеткам этих водорослей. Несмотря на качественные отличия в липидном и ЖК составе внеклеточных ОВ различных групп водорослей, в количественном отношении накопление этих веществ в средах близко и имеет важное значение для функционирования культур водорослей и природных сообществ фитопланктона.

2.3. Процессы выделения клетками водорослей органических веществ

Выделение клетками органических веществ, таких как сахара, аминокислоты, органические кислоты в нормальных условиях, определяется, главным образом, диффузией через плазмалемму. Скорость диффузии определяется концентрационным градиентом и проницаемостью мембраны для этих соединений [47]. Для выделения витаминов, гормонов, ферментов предполагают активные механизмы экскреции [1], что однако, ставится под сомнение, как и сама возможность выделения органических веществ клетками водорослей в нормальных условиях. Наиболее вероятный способ выделения крупных молекул, таких как полисахариды, полипептиды, сложные фенолы, состоит в слиянии внутриклеточных везикул, содержащих макромолекулы, с плазмалеммой, в результате чего происходит потеря их клетками [34]. Доказательств существования активных механизмов выделения органики аналогичных тем, что присущи высшим растениям (секреция, обратный пиноцитоз), для водорослей пока неизвестно. Однако, процесс выделения ВОВ водорослями можно считать энергозависимым, подтверждением чему служит факт увеличение скорости выделения ОВ при действии неблагоприятных факторов, например, высоких интенсивностях света, лимитировании CO_2 для фотосинтеза, низкие значения pH, недостаток минерального питания. При исследовании состава внеклеточных СЖК у *Spirulina platensis* было высказано предположение, что выделение СЖК в среду происходит с помощью какого-то белка-переносчика, возможно, специфической ацилтрансферазы,

поскольку ферменты этой группы в клетке способны трансформировать ЖК с ацилкоэнзима А на глико- и фосфолипиды.

Развитие водорослей, в частности, зеленых, сопровождается постепенным накоплением органики в среде. Однако, данные о количестве внеклеточных органических веществ, полученных разными исследователями, не совпадают. Для пресноводных водорослей приводится величина 7-50% [51], 20-55% [51] от общего ассимилированного углерода. Количество выделенного углерода, отнесенное ко всему количеству, фиксированному за 1 ч экспозиции, у 33 штаммов водорослей на свету с $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ составило всего лишь 0.2-3,0% [15,25]. В то же время в опытах с растущими культурами (26 штаммов) водорослей доля накапливаемых в среде ОВ достигала к 3-10 суткам 5-10% [19]. Процесс выделения ОВ клетками водорослей считают нормальной физиологической функцией [47] и объясняют его пассивной диффузией соединений и активным транспортом [63]. Однако, существует также точка зрения, что выделение РОВ нормальными клетками составляет незначительную часть от общего баланса органического углерода клеток и становится существенным лишь в условиях несбалансированного роста и под воздействием стресса. Одним из наименее изученных и противоречивых остается вопрос о происхождении внеклеточных ОВ [26,27]. Авторами установлена зависимость выделения ОВ от фазы развития культуры *C. pyrenoidosa* S-39 (табл. 1).

Таблица 1. Уравнения регрессии процесса накопления ОВ в средах *Chlorella. Pyrenoidosa* S-39 по фазам развития культуры. Обозначения: БМЖ – биомасса живых клеток; БММ – биомасса мертвых клеток; N – численность клеток.

Фазы развития культуры	Уравнения регрессии	Вероятность Р (%)
Логарифмическая, 2-5 сут	$\text{ОВ} = 12,03 + 19\text{БМЖ} + 0,64\text{N} + 0,16\text{БММ}$	91 (БМЖ)
Линейного роста, 5-15 сут.	$\text{ОВ} = 0,34 + 0,06\text{БМЖ} + 5,6\text{БММ}$	90 (БМЖ)
Стационарная, 15-20 сут.	$\text{ОВ} = 13 - 0,5\text{БМЖ} + 0,7\text{N} + 0,25\text{БММ}$	84 (БММ)
Отмирания, после 20 сут.	$\text{ОВ} = 21 + 0,31\text{БММ}$	98 (БММ)

Ясно, что ОВ являются продуктами автолиза клеток водорослей и

результатом прижизненных выделений, но не выяснен вклад каждого из этих процессов. Одни авторы считают, что 15-50%, или даже до 75% биомассы отмирающих клеток становятся частью среды, другие утверждают, что определяющим является процесс прижизненного выделения, связанный в значительной степени с размножением клеток [30].

2.4. Биохимическая характеристика водоросли *Chlorella*

В одном литре суспензии *Chlorella* биомасса составляет 6-10г, при этом численность клеток достигает 50-60 млн. в 1 мл. Эффективность влияния хлореллы на животных снижается при повышении или понижении плотности клеток в суспензии.

Chlorella имеет следующий биохимический состав (в % сухой биомассы):

- Белок – 55%
- Липиды – 12%
- Углеводы – 25%
- Зола – 8%

Содержание аминокислот в *Chlorella* (г/кг воздушно-сухого вещества), следующее:

- Глутаминовая кислота – 31,84
- Аспарагиновая кислота – 25,66
- Лейцин – 21,68
- Аланин – 20,13
- Валин – 17,58
- Глицин – 17,02
- Треонин – 13,66
- Фенилаланин – 12,06
- Серин – 11,60
- Изолейцин – 11,30
- Пролин – 9,78
- Лизин – 8,78
- Тирозин – 8,25
- Аргинин – 8,17
- Цистин – 7,53
- Триптофан – 5,11
- Метионин – 4,82
- Гистидин – 1,51

В суспензии хлореллы имеются все известные на сегодняшний день витамины. Как известно, витамины B12 и D растениями не синтезируются, однако в *Chlorella* они присутствуют в значительном количестве. В 100 г

сухой *Chlorella* содержится 7-9 мкг витамина B12 и 100 мг витамина D. В биомассе *Chlorella* витамина С столько же, сколько в лимоне, а витамин К имеет важное физиологическое значение для организма.

Содержание в *Chlorella* некоторых витаминов следующее (мкг/г сухого вещества):

- Каротин – 1341
- Токоферол (Е) – 180
- Никотиновая кислота – 140
- Рибофлавин (В2) – 7,0
- Пиридоксин (В6) – 5,3
- Тиамин – 4,2

2.5. Электроспектроскопия в оценке функционального состояния клеток и культур микроводорослей

Среди существующего множества методов при мониторинге загрязняющих или воздействующих на окружающую среду факторов приоритет следует отдать инструментальным методам массового и быстрого анализа, которые призваны обеспечить оценку влияния на биологические объекты достаточно широкой номенклатуры опасных неорганических и органических веществ. К одним из таких методов анализа, обладающим определенными преимуществами перед другими, относится изучение поведения биологических клеток и тканей при прохождении через них постоянного или переменного электрического тока, причём последнем случае в зависимости от его частоты, которая сводится к регистрации и анализу их электрических свойств – сопротивления R и ёмкости C . Более информативным методом является измерение электрических свойств биологических клеток и тканей в переменном электрическом поле в зависимости от его частоты или электроспектроскопия.

Электрические свойства в общем случае определяются двумя основными параметрами среды – проводимостью δ и диэлектрической проницаемостью ϵ , величины, которых зависят от частоты электрического поля и температуры среды [64]. В биологической среде присутствуют как свободные, так и связанные заряды, которые под действием внешнего переменного электрического поля, могут перемещаться или ориентироваться. Такое разделение на свободные и связанные весьма условно, поскольку заряды, например, ионы, являющиеся свободными в однородной среде, при перемещении внутри клетки ограничены мембранами или другими клеточными структурами. Процесс изменения положения зарядов под действием электрического поля представляет собой поляризацию, в которой различают несколько видов. Процессы поляризации связаны с изменением напряженности внешнего электрического поля от нулевого значения до максимальной величины, когда перемещение зарядов или ориентация

диполей, связанные с преодолением сил вязкости или межмолекулярного трения, не происходит мгновенно, а требует некоторого времени. При противоположном изменении напряженности поля весь процесс протекает в обратном направлении. Этот процесс представляет собой релаксацию, а время за которое поляризация достигает предельного значения при возрастании напряженности электрического поля от нуля до максимальной величины является временем релаксации. Процесс поляризации в реальной клетке очень сложен: он может включать несколько описанных выше идеальных механизмов поляризации одновременно, которые накладываясь друг на друга дают иногда довольно сложную картину.

Характер взаимодействия переменного электрического поля с биологическими средами на микроскопическом уровне определяется свойствами входящих в состав его тканей молекул. Анализ их поведения, а также мембранных и клеточных структур, необходим для понимания механизмов действия и на других уровнях организации биологических объектов. В данном случае представляют интерес те виды поляризации, которые определяют молекулярные механизмы поведения биологических сред в переменном электрическом поле.

Содержание в среде молекул, обладающих дипольным моментом или полярных молекул, определяет дипольную или ориентационную поляризацию. Дипольными моментами обладают, например, молекулы воды и, благодаря диссоциации ионогенных групп и адсорбции ионов, белка. Полярные молекулы представляют собой жесткий, т.е. фиксированный диполь в отличие от других неполярных, у которых дипольный момент индуцирует внешнее электрическое поле и который исчезает в его отсутствие. Свободные полярные молекулы в электрическом поле ориентируются в соответствии с его частотой, причем в той мере, которую допускает их тепловое движение. Наличие сильной связи между соседними молекулами ограничивает их ориентацию в поле, благодаря чему их поворот происходит только на небольшие углы. Поляризации дипольных молекул также препятствует их тепловое движение, причем, чем выше температура, тем сильнее ее влияние и тем меньше число ориентированных диполей. Степень ориентированности диполей с увеличением частоты снижается и, начиная с определенного значения, достигается такая стадия, когда уже ни один диполь не способен к ориентации. В этих условиях среда ведет себя как неполярное вещество, поскольку ориентация диполей происходит хаотично.

Гетерогенность биологической среды, которая в первую очередь обусловлена присутствием мембран, проявляющих компартментализирующую функцию, способствует возникновению другого вида поляризации – макроструктурной. При ней свободные заряды под действием поля перемещаются в пределах включений, образованных слоями с различными электрическими характеристиками. Невозможность дальнейшего переноса зарядов формирует у проводящего включения

дипольный момент, которое ведет себя подобно гигантской полярной молекуле. В биологических средах в формировании макроструктурной поляризации участвуют не только расположенные на поверхности клетки мембраны, но и внутриклеточных структур, например, ядра или органелл.

В системе твердое тело-жидкость поверхность раздела две несмешивающихся фаз представляет собой тонкий слой, свойства которого характеризуются существенным отличием. Если жидкость является полярной, то за счёт избирательной адсорбции одного иона он оказывается в избытке на поверхности, а другой – в избытке в жидкой фазе. Под влиянием полярной дисперсионной среды на поверхности происходит диссоциация ионогенных групп на поверхности клетки, а в дисперсионной среде за счёт электростатического притяжения образуется компенсирующий слой противоионов. Эти процессы приводят к формированию на поверхности клетки двойного электрического слоя, в котором различают плотную или адсорбционную часть, расположенную на от поверхности на расстоянии 1-2 молекул и более подвижную или диффузную. Перемещение диффузной части двойного электрического слоя относительно плотной во внешнем электрическом поле происходит по границе скольжения, расположенной преимущественно в диффузной части.

Для находящейся в водной среде клеток водорослей, наружная мембрана которых легко проницаема для воды, некоторых ионов и небольших молекул, можно выделить несколько слоев, свойства которых отличаются от характеристик дисперсионной среды. Прежде всего это ионная атмосфера, локализованная вблизи ионогенных групп клеточной поверхности, ближе расположена капсула полисахаридной или полипептидной природы и затем собственно мембрана клетки, включающая такие компоненты, как белки, мукопептиды, липиды. Состояние поверхности определяет такие электрические характеристики клетки как поверхностный заряд и поверхностная проводимость. Заряды на поверхности клеток большинства микроводорослей расположены достаточно равномерно и поэтому они не обладают поляризованностью. При наложении внешнего электрического поля происходит смещение свободных и, в определенных пределах, связанных зарядов как структурных компонентов клеточной стенки, так и окружающего слоя противоионов, в результате чего клетка приобретает наведенный (индуцированный) дипольный момент. Этот процесс происходит благодаря тангенциальному перемещению ионов диффузной части двойного слоя границе раздела в одну сторону, а частиц дисперсной фазы – в другую. Нарушенное присутствием поля равновесие восстанавливается за счет диффузии, которая зависит от температуры среды. Все эти отклики со стороны содержащихся в биологической среде зарядов на действие поля, осуществляющиеся в виде их ориентации или перемещения в среде, являются, вне зависимости от лежащих в их основе механизмов, инерционными процессами. Постепенное нарастание или, наоборот, снижение поляризации

при мгновенном увеличении или уменьшении напряженности действующего электрического поля, называется релаксацией, а время, в течение которого осуществляются эти процессы – временем релаксации τ_0 . Диэлектрические релаксационные процессы определяют зависимость электрических параметров биологической среды от частоты или дисперсию проводимости σ и диэлектрической проницаемости ϵ .

Для кривой зависимости или кривой дисперсии электрических параметров R и C от частоты характерны две особенности – высокие значения ϵ на низких частотах и три основные области релаксации, обозначаемые по общепринятому соглашению как α -, β -, и γ - дисперсии на низких, средних и высоких частотах соответственно [13,64]. В том диапазоне частот, где возникает диэлектрическая дисперсия, находится частота релаксации ω_0 , при которой поглощение энергии внешнего поля достигает максимального значения. Частота релаксации ω_0 , представляет собой обратную величину времени релаксации τ_0 и равна

$$\omega_0 = 1/\tau_0 \quad (1)$$

где $\omega_0 = 1/2 \pi f$ характеризует собственную частоту колебаний релаксатора. Во время релаксационных процессов энергия электрического поля преобразуется в кинетическую энергию молекул, что обуславливает возникновение поглощения на этой частоте.

Область α -дисперсии располагается в диапазоне частот $1-10^4$ Гц и механизм ее возникновения связан с релаксацией подвижных ионов, окружающей любую клетку с фиксированными на ее поверхности зарядами. Формирование β -дисперсии (10^4-10^8 Гц) происходит за счет обусловленной клеточными мембранами гетерогенной структуры биологической среды и по имени впервые описавших ее механизм носит название макроструктурной релаксации Максвелла - Вагнера. Механизм β -дисперсии связан с электрически неоднородным строением клетки и является следствием поляризации мембраны вне- и внутриклеточными ионами при релаксационных процессах на границе раздела мембрана-окружающий раствор. И, наконец, γ - дисперсии возникает в результате вращения небольших молекул, обладающих дипольным моментом, например, воды. Этот вид релаксации, связанные с поляризацией полярных молекул был впервые описан П.Дебаем, поэтому его иногда называют дебаевским. Дополнительный вклад в β -дисперсию вносят, содержащиеся в клетках белки, эффект которых проявляется на более высоких частотах. В области γ - дисперсии вращение аминокислот, частичное заряженных боковых групп белков и молекул связанной с белками воды вносит дополнительную релаксацию, определяющую 5-дисперсию в диапазоне частот 10^8-10^9 Гц. Присутствие в клетках и тканях границ раздела в виде мембран ответственных за α -, β - дисперсии частично маскирует вклад отдельных молекулярных структур, поведение которых проявляется на более высоких

частотах.

Механизмы, определяющие формирование областей дисперсии различны по своей природе, но в подавляющем большинстве случаев могут плавно переходить по принципу суперпозиции из одного в другой. По сути дела, из всех видов дисперсии только α -дисперсия достаточно жёстко связана с одной частотной областью - от 0,3 до 20 ГГц, тогда как другие характеризуются существенно меньшей детерминированностью. Наиболее изученной и информативной с точки зрения оценки функционирования и самой клетки, и её мембраны, и внутренней среды, является β -дисперсия.

Поскольку основной механизм β - дисперсии связан с накоплением на мембране клетки зарядов в виде ионов из внешней и внутренней среды, то именно она нашла своё применение в различных подходах к оценке состояния клетки и её мембранных структур.

В целях более подробного анализа принято целесообразным использовать эквивалентные схемы, более детально выражающие электрические свойства клеточных суспензий или тканей. Наличие в клетках и тканях границ раздела в виде мембран определяет наиболее элементарную эквивалентную схему подобной среды как последовательное или параллельное соединение активного сопротивления R и ёмкости C . Общее сопротивление или импеданс на переменном токе Z для последовательного соединения равен:

$$Z = R_p + jX_p \quad (2)$$

где R_p и C_p соответственно сопротивление и ёмкость в последовательном соединении, X_p - реактивное сопротивление, равное

$$X_p = \frac{1}{\omega C_p} \quad (3)$$

где $\omega = 2\pi f$, $j = \sqrt{-1}$ и f - частота на которой проводится измерение.

При параллельном соединении активного сопротивления R_s и ёмкости C_s , общее сопротивление или адмиттанс Y равен:

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{R_s} + j\omega C_s \quad (4)$$

Более детальная эквивалентная схема, состоящая из элементов с сосредоточенными параметрами для суспензии сферических клеток, обладающих аналогичными частотными характеристиками показана на рис.1.

Омическое сопротивление мембраны R_m определяется

определяется относительно свободно проходящими через неё под действием внешнего электрического поля ионами, а ёмкость C_m - связанными, не проходящими через неё. Ёмкость мембраны C_m включена параллельно с сопротивлением R_m мембраны, тогда как включённое последовательно с ними сопротивление R_j представляет электрические параметры внутреннего содержимого клетки. Шунтирующее сопротивление R_0 отражает электрические параметры межклеточной среды. Физический смысл этой схемы заключается в следующем: часть переменного тока проходит в обход клетки через шунтирующую межклеточную среду, в то время как другая часть - через мембрану и внутреннее содержимое клетки. Анализ эквивалентной схемы показывает, что на низких частотах (в области α - и в самом начале β -дисперсии) суммарный потенциал, приложенный к клетке, разряжается через ёмкость C_m , а на более высоких - внутри клетки. Величина ёмкости C_m не зависит от частоты и для мембран различных биологических объектов имеет стабильную величину 0.8-1.0 мкФ/см². Напротив, сопротивление R_m в определённых пределах достаточно вариабельно, поскольку определяется и существенно зависит от проницаемости мембраны для ионов. Поскольку R_j и R_0 как сопротивления внутреннего содержимого клетки и окружающей их межклеточной среды определяются содержанием в них ионов, то в области α -и в начале β -дисперсии они не зависят от частоты.

Если рассматривать электрические свойства суспензий сферических клеток в проводящей среде при низких частотах электрического поля, то соотношение между макроскопическими характеристиками суспензии в целом и микроскопическими свойствами самих клеток может быть представлена в следующем виде:

$$\frac{\rho/\rho - 1}{\rho_1/\rho + 2} = \Phi \frac{\rho_1/\rho_2 - 1}{\rho_1/\rho_2 + 2} \quad (5)$$

где ρ - соответственно удельные сопротивления взвеси, проводящей среды и взвешенного материала, Φ - относительный объём, занятый взвешенными частицами. Это выведенное Максвеллом уравнение, было им впоследствии применено для описания электрических свойств взвеси проводящих сферических частиц в проводящей среде. Недостаточная корректность для использования этого уравнения применительно к биологическим исследованиям послужила причиной дальнейшего развития теории Максвелла, которое привело Н.Фрике, а затем С.Велик и М.Горин предложили уравнения, позволяющие определить удельное сопротивление взвеси непроводящих эллипсоидов, получившее название уравнения Velick-Gorin:

$$\rho = \rho_1 \left(1 - \frac{\Phi f}{\Phi - 1} \right) \quad (6)$$

где ρ , ρ_1 , ρ_2 и Φ соответствуют в уравнении (4), а f или фактор формы характеризует форму частиц и для сферических частиц равен 1.5, а для

других структур $f > 1.5$. Это уравнение применимо только в том случае, если бы клетки, точнее их мембраны, не были проводящими структурами. С помощью выражения (4) возможно охарактеризовать некоторые процессы происходящие в клетках, исходя из соотношения между сопротивлением клеточной мембраны, связанное с её проницаемостью, и сопротивлением проводящей среды. Используя подобный метод, В.Остергаут выполнил обширные исследования по влиянию различных повреждающих факторов на проницаемость *Laminaria agardhii* и других водорослей, показав, например, на основе измерения сопротивления антагонистические отношения ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} в их влиянии на проницаемость, а также некоторых анестетиков. Измерение частотной зависимости электрических свойств клеточной суспензии обладает ещё большей информативностью, поскольку позволяет определить ёмкость клеточной мембраны, степень изменения её проницаемости, состояние ионов внутри клетки, и динамику их изменений при действии повреждающих факторов. Так, при нарушении проницаемости мембраны её сопротивление начинает падать и в меньшей степени зависеть от частоты, а при полной гибели клетка, с точки зрения электрических свойств, не отличается от окружающей её проводящей среды. Этот эффект обнаруженный впервые В.Ж.Луэти при исследованиях сопротивления в диапазоне частот 10^4 — 10^6 Гц растительных тканей при их необратимых повреждениях, был несколько позже распространен Б.Н.Тарусовым и на другие виды ткани, как способ определения их функционального состояния и жизнеспособности [44]. Предложенный метод заключается в измерении сопротивления клеток в двух точках дисперсионной кривой - на низкой R_H (10^4 Гц) и бесконечно высокой для проводимых измерений частотах R_∞ , которые чаще всего находятся в области 10^4 — 10^7 Гц, отношение которых K_n равно

$$K_n = \frac{R_H}{R_\infty} \quad (7)$$

носит название коэффициент поляризации, причём чем хуже функциональное состояние клетки, тем меньше величина этого коэффициента. Для большинства клеток и тканей величина K_n в зависимости от уровня метаболизма колеблется в диапазоне от 5 до 15, а при гибели значение стремится к 1. По изменению величины коэффициента поляризации можно однозначно судить о степени нарушения проницаемости и уровне жизнеспособности исследуемых клеток. Возможно также осуществлять оценку в линейной области дисперсионной кривой при помощи крутизны или коэффициента дисперсии K_d , представляющее собой отношение сопротивлений в её низко- и высокочастотных участках. Другой характеристикой уровня функционирования при анализе электрических свойств клеточных суспензий и тканей может служить тангенс угла потерь $\text{tg}\delta$, который для эквивалентной схемы приведенной на рис.1 вычисляется по формуле:

$$\operatorname{tg} \delta = 1 / 2 \pi f \quad (8)$$

Преимущества применения как коэффициентов поляризации K_p и дисперсии K_d , так и $\operatorname{tg} \delta$ заключается в том, что для определения этих показателей не требуется знать абсолютные величины и можно пользоваться измеренными значениями, хотя с другой стороны они не позволяют судить о поляризационных процессах на мембране, связанные с её проницаемостью. Для этих целей используется построение зависимости реактивного сопротивления X от активной составляющей R импеданса в последовательной эквивалентной схеме на всех частотах, на которых проводилось измерение. График этой зависимости представляет собой полуокружности с центром, смещённым вниз от оси активной составляющей импеданса. Угол образованный линией, соединяющей центр полуокружности с точкой её пересечения с осью активной составляющей и вертикалью, проведенной из центра, у всех биологических объектов всегда меньше 90° и является динамической характеристикой проницаемости мембраны для проникающих и непроникающих через неё ионов и заряженных молекул [50]

2.6. Флуоресценция хлорофилла и ее использование для определения функционального состояния водорослей

Как уже отмечалось выше, основная часть энергии света, поглощенного пигментами фотосинтезирующих организмов, расходуется в электронно-транспортных и сопряженных процессах, в результате которых образуется АТФ и НАДФН. Часть поглощенной энергии в процессе ее миграции к фотохимически активным РЦ растрачивается, в частности, в результате излучательных потерь - флуоресценции. Механизмам и природе флуоресценции хлорофилла посвящено много работ в связи с рассмотрением первичных процессов фотосинтеза [29]. При комнатной температуре квантовый выход флуоресценции низок и в спектре флуоресценции основной является полоса 685 нм, принадлежащая хлорофиллу светособирающей антенны ФС 2 и дополнительная полоса при 735 нм. В этих условиях флуоресценция длинноволновых форм хлорофилла, принадлежащих ФС 1, тушится за счет эффективного захвата энергии РЦ ФС 1 [60].

По интенсивности флуоресценции, возбуждаемой постоянным светом можно определить концентрацию хлорофилла в морской воде в пределах 0,04-2 мг хлорофилла а/м^3 . С помощью погружаемых флуориметров хлорофилл определяли в различных горизонтах при изучении вертикального распределения фитопланктона [32]. Лазерные спектрофлуориметры позволили вести дистанционные воздушные съемки распределения фитопланктона путем анализа спектров водной поверхности [23]. Флуоресценция водорослей и растений может служить показателем фотосинтетической активности и физиологического состояния нативных

организмов. При освещении водорослей после их адаптации к темноте квантовый выход флуоресценции меняется во времени и стационарный уровень флуоресценции устанавливается через несколько мин. Это отражается на индукционной кривой флуоресценции как результат суперпозиции процессов тушения фотохимической и нефотохимической природы [53]. Сразу после начала освещения происходит быстрый - 1 мкс - рост флуоресценции до уровня F_0 (начальная флуоресценция). От начального уровня через промежуточный уровень флуоресценция возрастает до максимального (F_m - максимальная флуоресценция). Возрастание от уровня F_0 до F_m называют переменной флуоресценцией (F_v), количественно рассчитываемой как $F_v = F_m - F_0$. Появление переменной флуоресценции связано с процессом восстановления Q_A - первичного хинонного акцептора ФС 2 [54]. Освещение клеток или хлоропластов в присутствии диурона приводит к быстрому восстановлению Q_A . Реакционный центр ФС 2 из открытого состояния переходит в закрытое состояние и соответственно, наблюдают высокий выход флуоресценции F_m , так как при этом отсутствует фотохимическое тушение энергии возбуждения.

Установлено, что F_0 и F_v имеют разную природу. И начальная, и переменная флуоресценция излучаются антенными пигментами ФС 2, но F_D - это потери энергии, происходящие до того, как возбуждение впервые будет захвачено РЦ ФС 2. При фотохимическом или темновом восстановлении Q_A появляется излучение с большим временем жизни, связанное с рекомбинацией разделенных зарядов в паре P_p - $P680^+$, которое и представляет собой переменную флуоресценцию [29]. Ранее было обнаружено, что феофитин (Ph) является промежуточным акцептором электронов между $P680$ и Q_A , а переменная флуоресценция - результат рекомбинации восстановленного Ph с окисленным $P680$ в условиях, когда быстрый перенос электрона с Ph на Q_A невозможен.

Относительный выход переменной флуоресценции коррелирует с квантовым выходом выделения кислорода. Этот параметр выражается как F_v/F_m , где $F_v = F_m - F_0$, характеризует эффективность восстановления первичного хинонного акцептора Q_A и может служить показателем функциональной активности ФС2, эффективности первичных процессов фотосинтеза. Переменная флуоресценция (F_v) была использована для оценки фотосинтетической активности водорослей *in vivo*. В дальнейшем оказалось, что F_v коррелирует со скоростью фотосинтеза, определяемой радиоуглеродным методом, со скоростью фотосинтетического выделения кислорода, с концентрацией хлорофилла. Установлена также высокая корреляция (0,8-0,9) между относительным выходом переменной флуоресценции и первичной продукцией, определяемой радиоуглеродным методом для морского и пресноводного планктона. Коррелятивные связи между флуоресценцией хлорофилла и первичной продукцией базируются на

связи параметров флуоресценции с эффективностью первичных процессов фотосинтеза [53], эффективностью восстановления Q_A и квантовым выходом выделения кислорода, активностью ФС 2 и квантовым выходом ассимиляции CO_2 . Связь активности ФС2 с продукционными характеристиками фитопланктона была показана на оз. Байкал путем изучения сезонной динамики относительного выхода переменной флуоресценции [23].

Исследование индукционной кривой флуоресценции показало существование двух видов РЦ ФС 2, отличающихся величиной квантового выхода восстановления Q_A . При блокировании оттока электронов от Q_A к Q_B и далее, к ФС 1, наблюдали двухфазное нарастание флуоресценции: быструю, сигмоидную часть, связывают с восстановлением ос-центров, медленную экспоненциальную - с восстановлением Р-центров.

Таким образом, исследование флуоресценции хлорофилла в применении к продукционным характеристикам водоемов перспективны, поскольку позволяют оценивать эффективность первичных реакций фотосинтеза нативных фотосинтезирующих объектов в лабораторных и полевых условиях при изменении факторов среды.

2.7. Физиологическая и антибактериальная активность внеклеточных метаболитов микроводорослей

Физиологическая активность ВОВ водорослей в настоящее время не вызывает сомнений. Большинство водорослей способны выделять в среду соединения, ингибирующие их собственный рост и рост других видов в сообществе. Наиболее активными компонентами ВОВ водорослей являются фенольные соединения и липиды, в частности ЖК [32].

Развитие микроводорослей сопровождается постепенным накоплением в среде растворенных органических веществ (РОВ) [26]. В фильтрах водорослей обнаружены белки, липиды, аминокислоты, фенольные соединения, углеводы, гормоны, антибиотики, органические кислоты и другие [19,32]. Некоторые группы соединений из состава РОВ обладают физиологической активностью и могут быть регуляторами роста и развития как по отношению к самим продуцентам, так и к другим организмам, в частности к бактериям. К таким функционально активным соединениям относят внеклеточные липиды и фенолы, тогда как продукты углеводного и азотного обмена считают функционально неспециализированными в физиологическом или биохимическом отношении [10,32].

Наиболее распространенными типами отношений между водорослями и бактериями являются синергизм и антагонизм. Антагонизм характеризуется резким уменьшением численности бактерий, вплоть до полного их исчезновения, в периоды интенсивного развития фитопланктона. В сильно загрязненных органическими стоками водах при обильном развитии

гетеротрофных микроорганизмов может происходить подавление развития фототрофных организмов [22]. Поэтому способность водорослей подавлять развитие бактерий открывает возможность регулировать этот процесс, что имеет важное практическое значение при культивировании водорослей в нестерильных условиях для целей биотехнологии или аквакультуры. Способность водорослей выделять вещества, являющиеся активными по отношению к самим продуцентам или бактериям свидетельствует о значении внеклеточных метаболитов в регуляции процессов роста и развития как продуцентов, так и сопутствующих видов при совместном культивировании или в естественных условиях.

При выяснении причин гибели бактерий в растущих культурах водорослей полагали, что свет лишь обеспечивает условия для быстрого роста фототрофов, что приводит к изменению физико-химических условий среды, что делает ее непригодной для роста микроорганизмов. Ранее нами установлено, что действительно при росте культур водорослей, особенно в начале кривой роста происходит резкое снижение окислительно-восстановительного потенциала и величины рН [26]. Однако в дальнейшем было высказано предположение, что свет может инициировать образование веществ, обладающих антибактериальной активностью из неактивных предшественников. При этом имели в виду фотохимические дериваты хлорофиллидов при активном росте и свободные жирные кислоты (СЖК) в период отмирания культур водорослей [22]. Кроме того, было показано в природных условиях на Мазурских озерах, что свет не является фактором, прямо ингибирующим развитие бактерий.

Несмотря на имеющиеся данные, остается невыясненным ряд вопросов о причинах физиологической активности внеклеточных продуктов и проявления ими бактерицидного и альгицидного действия. В начале кривой роста происходит быстрое накопление индольной природы, которые могут оказывать стимулирующее действие по крайней мере на рост водорослей [39], фенольных соединений [37]. и подавлять рост бактерий за счет изменения физико-химических условий среды, а также ненасыщенных жирных кислот (НЖК), способных прямо или через продукты окисления подавлять фотосинтетические процессы [28].

В литературе имеются данные об увеличении на свету антибактериальной активности микроскопических водорослей и высказывалось предположение о выделении водорослями в среду антибактериальных веществ, активность которых на свету увеличивалась [17]. Авторы полагают, что при действии света на производные хлорофилла, в частности хлорофиллиды, образуются активные формы кислорода, которые оказывают антибактериальное действие и, кроме того, путем взаимодействия с молекулами пигментов, могут способствовать образованию антибактериально активных дериватов. Феофитинизация усиливает антибактериальный эффект, очевидно, в связи с высокой эффективностью

образования синглетного кислорода. В культуральных средах накопление антибактериально активных фотохимических дериватов хлорофиллидов происходило в результате интенсивного размножения клеток и максимальный антибактериальный эффект наблюдали в средах культуры, находящейся в конце экспоненциальной фазы роста.

Что касается пигментных антимикробных эффектов, то не исключено, что в кислород в основном стабильном (триплетном) состоянии реагирует с хлорофиллом в триплетном возбужденном состоянии, в результате чего пигмент переходит в основное (синглетное) состояние, а кислород в возбужденное синглетное состояние, обладающее, как и другие активные формы кислорода повреждающими свойствами и способностью участвовать в реакциях перекисного окисления липидом мембран микробных клеток. В дальнейшем могут происходить изменения физико-химических свойств мембран, в частности состояния белков, проницаемости мембран, подавление энергозависимых процессов. Кроме того, хорошо известно, что фотосенсибилизированные бактерии гибнут уже на обычном дневном свете в связи с образованием синглетного кислорода.

2.8. Активность внеклеточных метаболитов водорослей по отношению к водорослям - их продуцентам

Ранее было высказано предположение, что ингибиторы роста, выделяемые клетками водоросли *Chlorella*, особенно в старых культурах, являются НЖК или продуктами их окисления. Позже было установлено, что наиболее лабильной фракцией являются именно липиды и в первую очередь, НЖК, которые легко подвергаются перекисному окислению с образованием токсичных продуктов - перекисей, гидроперекисей, альдегидов, кетонов [40]. На этой основе было сделано заключение, что перекисное окисление липидов - основной источник гипотетических альготоксинов в водоёмах и культурах водорослей [41]. В дальнейшем было установлено, что СЖК способны накапливаться в культурах зелёных водорослей *Chlorella* в концентрациях до 10 мкМ и вызывать ингибирование фотосинтеза и роста водорослей [36].

В природных условиях изменение состава ЖК в поверхностном слое воды связывают с сезонной сукцессией фитопланктона: соотношением групп водорослей, общей численностью, соотношением хлорофиллов а, в, с. При этом степень ненасыщенности ЖК при низких температурах воды выше, чем при высоких. Также более высокую степень насыщенности ЖК в морской среде обнаружили в зоне апвеллинга, то есть в водах, обогащенных биогенными элементами [57]. Показано, что на оз.Бива в зимний период ЖК составляли до 30% от величины первичной продукции, что было, по мнению авторов, определяющим для С/Н-соотношения в составе органического вещества фитопланктона, а также оказывало влияние на рост численности

[58]. Жирные кислоты называют маркерами состояния экосистем при оценке процессов трансформации органического вещества морских вод. По составу ЖК в поверхностной плёнке воды приближенно определяют группы гидробионтов, участвующих в трансформации взвешенной органики, в частности, микроорганизмов. Продуцируемые водорослями СЖК, в основном, накапливаются в поверхностном слое воды и могут отражать фазы сезонной сукцессии планктона, процессы самоочищения водоёмов от загрязняющих веществ [55].

Прямые указания на подавление роста культур водорослей в связи с ингибированием фотосинтеза действием СЖК единичны [36]. Однако, существует достаточно убедительных данных об ингибирующем действии эндогенных ЖК на фотохимическую активность изолированных хлоропластов. Увеличение содержания СЖК в хлоропластах определяется повышением доступности галакто- и фосфолипаз к липидам тилакоидных мембран, в основном при неблагоприятных условиях. Так, было показано, что НЖК с 18 углеродными атомами, высвобождающиеся в наибольших количествах при старении хлоропластов, оказались наиболее эффективными в стимуляции набухания хлоропластов при экзогенном добавлении этих ЖК в концентрациях 200 мкМ/20 мкг хлорофилла/мл. Насыщенные ЖК с четным числом углеродных атомов (от 8 до 20) были менее эффективны. Ранее было обнаружено ингибирование реакции Хилла под действием СЖК, образующихся при эндогенном гидролизе фосфолипидов в процессе набухания хлоропластов при высокой температуре. Основные механизмы действия эндогенных ЖК на активность хлоропластов связывают с блокированием электронного транспорта (ЭТ) на донорной и акцепторной части фотосистемы 2 (ФС 2), регуляцией, в зависимости от концентрации, скорости ЭТ в ФС 1, а также с возможным ингибированием кислородвыделяющей системы путем освобождения Мп, как было показано для линоленовой (18:3) кислоты. Предполагаемые участки действия линоленовой кислоты на ЭТ-цепь ФС 2: между первичным донором электронов Z и РЦ Р680 и между первичным хинонным акцептором Q_A и феофитином на уровне хинонсвязывающих белков. СЖК при действии на изолированные хлоропласты ингибируют ЭТ на донорной стороне, а в высоких концентрациях инактивируют реакционные центры (РЦ) ФС 2, что сопровождается увеличением выхода постоянной (F₀) и подавлением переменной (F_v) флуоресценции. Очевидно, снижение выхода F_v за счет роста выхода F₀ связано со смещением с белка D2 в РЦ ФС 2 первичного хинонного акцептора Q_A.

Таким образом, биологическая активность внеклеточных ОВ водорослей, в частности фенольных соединений и ЖК, очевидна. Ингибирующее действие фенолов доказано для эндогенных соединений на примере подавления фотосинтетического ЭТ, фотофосфорилирования на изолированных хлоропластах. Внеклеточные липиды, особенно, ЖК,

рассматриваются как маркёры, отражающие состояние водных экосистем, а также как источники гипотетических аллотоксинов. Из литературы известно о прямом ингибировании СЖК фотохимической активности хлоропластов. Имеются отдельные сведения о подавлении внеклеточными ЖК роста культур водорослей, однако, данные о возможном действии внеклеточных ЖК на фотосинтетическую активность целых клеток водорослей практически отсутствуют.

Из литературы известно, что адаптивные реакции водорослей при изменении естественных факторов среды определяются пластичностью функциональных возможностей фотосинтетического аппарата, в значительной степени связанных с изменением процессов трансформации поглощенной энергии света в световой фазе фотосинтеза, что позволяет фотосинтезирующим организмам сохранить способность к росту и развитию. Очевидно, физиологически активные ВОВ, проникая в клетки водорослей, взаимодействуют с внешним мембранным комплексом, цитоплазмой, в зависимости от эффективности воздействия, могут приводить к адапционным перестройкам фотосинтетического аппарата зеленых водорослей, что должно повлечь за собой изменения общего физиологического состояния клеток водорослей и их продукционных способностей. Сохранению способности клеток водорослей к росту способствует также гетерогенность их популяций по функциональному состоянию как в природных, так и лабораторных условиях.

3. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ПОЛУЧЕНИЯ СУСПЕНЗИИ *CHLORELLA*

3.1. Объекты исследования

В качестве основного объекта исследования использовали аксеничную культуру водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick, штамм DMMSU-S-39. Культуру выращивали накопительным методом на среде Тамия в культуральных сосудах с 250 мл среды при температуре 37⁰ С и непрерывном освещении 40 Вт/м лампами ЛБ-80. Сосуд барботировали воздухом, очищенным пропусканием через систему ватных фильтров и обогащенным 2% CO₂, скорость тока воздуха 0,3 л/мин. Водоросли периодически проверяли на чистоту высевом на чашки со стандартными агаровыми средами МПА 1Б° сусло.

Водоросли рода *Chlorella* имеют шаровидные клетки, одетые гладкой оболочкой. Диаметр клеток 2,3-5,8 мкм. Размножение происходит только бесполым путем с образованием автоспор (8-16 от 1 клетки). Цикл развития от автоспоры до автоспоры составляет 9-11 ч.

Клеточная стенка двухкомпонентная. Наружный компонент - трехслойный, содержит спорополленин - очень устойчивое к действию

ферментов вещество. Внутренний более толстый компонент содержит целлюлозные микрофибриллы. [31,7].

Строение клетки рассматривалось с иммерсионным объективом (рис.1 А, Б).

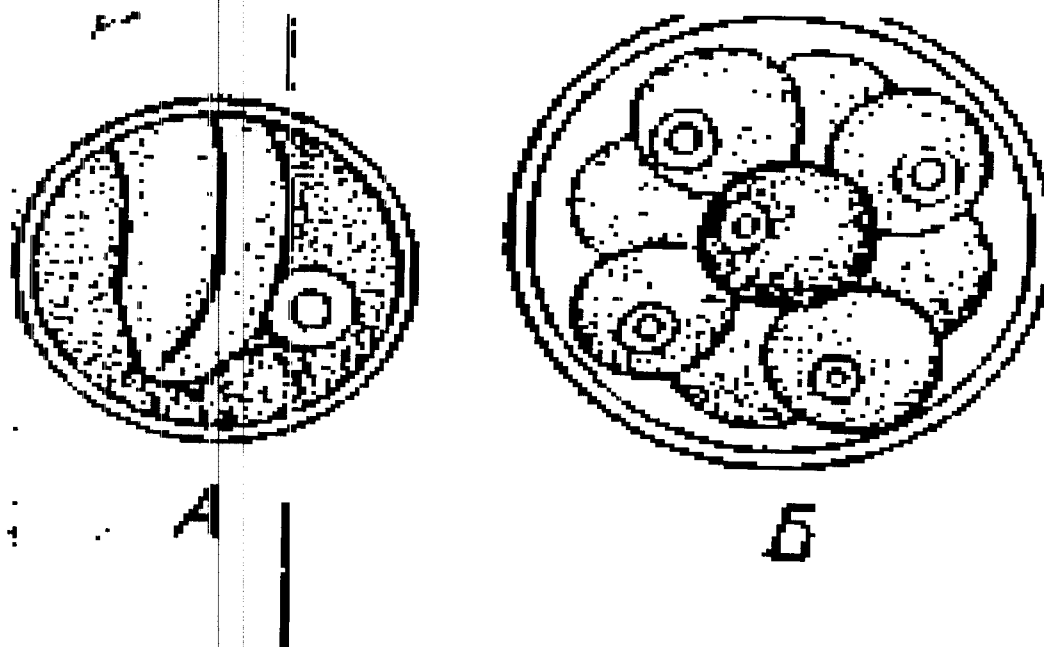


Рис.1 *Chlorella*. А — вегетативная клетка, Б — образование автоспор

После хранения на твердой агаризованной среде культуры пересевали и подращивали в течение 5-7 сут. на скошенной агаровой среде при температуре 25°C для мезофилов и 35°C для термофилов, освещенности 20 Вт/м в эксикаторах в атмосфере воздуха с периодической (1 раз в сутки) продувкой CO₂. С косяков культуры *Chlorella* пересевали на жидкие питательные среды Тамия. Значения pH сред приводили к 7,0. Водоросли предварительно и по ходу культивирования проверяли на бактериальную чистоту высевом на чашки Петри со стандартными агаровыми средами МПА-1Бо суело (1:1). Исходная плотность при посеве обычно составляла 1 млн/мл.

3.2. Методы исследования

Численность клеток определяли прямым счетом в камере Горяева, а также по оптической плотности при 540 нм на спектроэлектроколориметре с дальнейшим построением калибровочных кривых. Процент мертвых клеток учитывали подсчетом 500-1000 клеток путем окрашивания метиленовым синим. Ошибка не превышала 5-7 %. [25]. Количество общего ВОВ культуральных сред и биомассы клеток определяли после сжигания с бихроматом калия колориметрически на спектроэлектроколориметре [19]. Для этого клетки отделяли от среды 15 мин. центрифугированием при 5500 g с

последующим фильтрованием через мембранные фильтры с размерами пор 0,23 мкм.

Параметры быстрой флуоресценции хлорофилла суспензии клеток водорослей измеряли с помощью импульсного флуориметра. В установке используется слабый импульсный свет длительностью 40 мкс от лампы, возбуждающий флуоресценцию при срабатывании не более 3% РЦ пробы и действующий (7 Вт/м²) свет, изменяющий состояние РЦ ФС 2. Суспензии клеток водорослей приводили к оптической плотности 0,2 при 664 нм. Образцы адаптировали в темноте в течение 3 мин, затем измеряли интенсивность начальной (F_0) флуоресценции при действии импульсного зондирующего света. Интенсивность F_0 отражает излучательные потери энергии возбуждения при миграции ее к открытым РЦ. После этого в ячейку добавляли диурон (ДХММ) в конечной концентрации 10 мкМ и при действующем свете измеряли интенсивность флуоресценции на уровне F_m при восстановленном хинонном акцепторе Q_A . Относительный выход переменной флуоресценции, который характеризует эффективность восстановления Q_A в ФС2, коррелирует с квантовым выходом выделения кислорода и восстановления CO_2 , рассчитывали как F_v/F_m , где $F_v = F_m - F_0$.

Измерения и анализ электрических свойств (электроспектроскопию) микроводорослей *Chlorella pyrenoidosa* в диапазоне частот 10^3 - 10^7 Гц проводили следующим образом. Клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием при 5500 g в течение 15 мин с последующим фильтрованием через мембранные фильтры. Затем плотность упаковки клеток доводили до 0,6-0,7 трехкратным центрифугированием. Полученную суспензию в объеме 1,0 мл помещали в стеклянную ячейку с платиновыми электродами площадью 1 см². Для снижения влияния электрохимической поляризации на результаты измерения, преимущественно в области низких частот, электроды измерительной ячейки покрывались платиновой чернью. Потенциал на электродах ячейки для устранения нелинейных эффектов и появления перенапряжения в процессе измерений находился в области равновесного и не превышал 5-10 мВ. Термостатирование ячейки осуществляли с точностью $\pm 0,1^\circ C$; калибровку проводили по приготовленному из фиксана 0,1 N раствору КС1. Влияние ионного состава среды на величины R_s и C_s устраняли путем переноса клеток в раствор холинхлорида (2-гидроксиэтил триметиламмония хлорид), эквимольный среде. Затем производили электроспектроскопию -измерения частотной зависимости R_s (Ом) и C_s (мкФ) в области Р-дисперсии электропроводности (1 кГц - 10 МГц). Исходя из измеренных величин R_s вычислялись численные значения коэффициента поляризации (K_n) как отношение величин R_s на частоте 10 кГц, к R_s на частоте 10 МГц, служащего критерием жизнеспособности клеток. Для оценки процента живых клеток в процессе развития культуры, исходя из измеренных на частоте 1 кГц электрических параметров, по предложенной (Schwan, 1963; Fricke, 1963) формуле

рассчитывали (с учетом сферической формы клеток) среднее собственное сопротивление всех клеток водоросли в суспензии (Davey et al., 1992) и объемный индекс живых клеток (см. ниже формула 15). Измерения проводились на установке (рис.2), состоящей из широкополосного трансформаторного моста с индуктивно связанными плечами, позволяющий в диапазоне частот 10^3 - 10^7 Гц отдельно регистрировать с точностью $\pm 1\%$ активную и реактивную составляющие в пределах 10 - 10^6 Ом и $\text{КГ}'\text{-К})^6$ пФ соответственно (Перов, 1969).

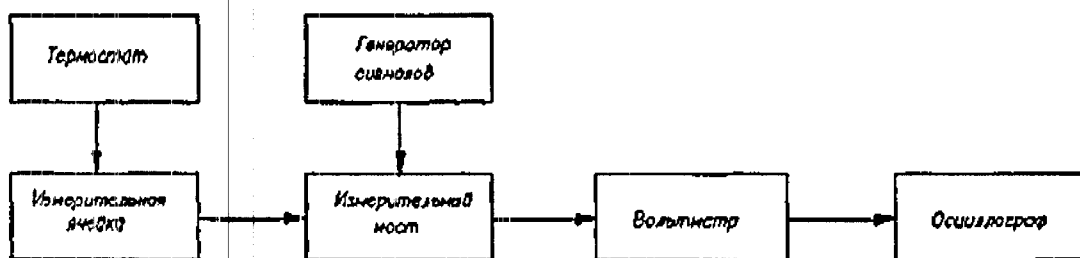


Рис. 2. Блок-схема установки для электроспектроскопии в диапазоне частот 1 кГц - 10 МГц

В конструкции моста предусмотрена возможность проводить измерения по параллельной схеме как прямым методом, так и методом замещения. Пересчет измеряемых величин R_s и C_s из параллельной эквивалентной схемы в последовательную является известным методическим приемом. Это связано с тем, что измерения проводятся по параллельной схеме замещения, что методически более удобно, а анализ электрических параметров клеточных суспензий проводится в последовательной схеме, поскольку сопротивление межклеточной среды R_o , сопротивление мембран клеток R_m и внутриклеточного содержимого R_i включены последовательно. Питание моста осуществлялось от генератора Г4-153, в качестве индикатора баланса использовался вольтметр ВЗ-42 с аналоговым выходом на осциллограф С1-65.

Основные обозначения и формулы для электроспектроскопии.

R_s - сопротивление в параллельной схеме замещения; C_s - ёмкость в параллельной схеме замещения; $\text{tg}\sigma$ - тангенс угла потерь в параллельной схеме замещения; ω — круговая частота;

R_p - сопротивление в последовательной схеме замещения; C_p - ёмкость в последовательной схеме замещения; X_p - ёмкостное сопротивление в последовательной схеме замещения; Z - импеданс в последовательной схеме замещения Y - адмиттанс в параллельной схеме замещения

$$1. \operatorname{tg} \delta = \frac{1}{\omega R_s C_s}, \text{ где } \omega = 2\pi f \quad (9)$$

$$2. R_p = \frac{R_s}{1 + \omega^2 C_s^2 R_s^2} \quad (10)$$

$$3. C_p = \frac{1 + \omega^2 R_s^2 C_s^2}{\omega^2 R_s^2 C_s^2} \quad (11)$$

$$4. X_p = \frac{1}{\omega C_p} \quad (12)$$

$$5. Z = R_p + X_p \quad (13)$$

$$6. Y = \frac{1}{Z} \quad (14)$$

$$7. R_o/R_s = 2(1-\Phi)/(2+\Phi) \quad (15)$$

где R_o - сопротивление суспендирующей среды (межклеточной жидкости);

R_s - сопротивление суспензии клеток;

Φ - относительный объем (объемный индекс), занятый живыми клетками.

Таким образом % живых клеток определяется в относительных единицах объема (Φ) и пересчет на число клеток можно осуществить, зная объем единичной клетки по табличным данным.

Для испытания физиологической активности метаболитов использовали среду водоросли *Chlorella pyrenoidosa* с конца экспоненциальной фазы роста (7 сут., N клеток приводили к 500 млн/мл колориметрически), как один из вариантов - 10-кратно сконцентрированную среду водорослей с помощью роторного испарителя при температуре 30° С. рН среды довели до 7 ед. концентрированной HCl.

Экстракцию культуральной среды проводили последовательно различными растворителями по увеличению их полярности. В первом случае 250 мл среды экстрагировали 250 мл гексана. Гексановый экстракт сливали, а культуральную жидкость далее экстрагировали 250 мл бензола, затем аналогично этилацетатом однократно или с последующей экстракцией при рН 3-4 ед. В гексан переходят в основном, СЖК, в бензол - липиды, в этилацетатные вытяжки (при рН 7 и 4) - фенольные соединения [34]. Полученные экстракты упаривали досуха на роторном испарителе (40° С), переносили в 5 мл гексана), далее хранили в холодильнике. Все операции по экстрагированию проводили в условиях слабой освещенности. В отдельных случаях для оценки физиологической активности получали и хлороформ-метанольные экстракты сред водоросли. В этом случае использовали систему хлороформ-метанол-вода в отношении 1:2:0,8. В водно-метанольной фракции содержатся водорастворимые нелипидные примеси (сахара, аминокислоты, соли и др.), а хлороформный слой содержит липиды, практически свободные от загрязнений.

Во втором варианте схема экстракции была следующей. Для получения экстрактов пигментной природы сконцентрированную в роторном испарителе при 30° С до выпадения солей среду трижды экстрагировали ацетоном (18 ч и 2 раза по 2 ч), затем экстракты фильтровали через бумажный фильтр, упаривали при 30° С, осадок растворяли в ацетоне (в 5 мл). Экстракт содержал вещества пигментной природы (хлорофиллиды и продукты разложения пигментов) с примесями липидов и СЖК. Для определения активности экстрактов их стандартизовали по численности клеток культуры водоросли в конце экспоненциальной фазы роста (7 сут.). Для экстракции липидов упаренную до выпадения солей среду дважды экстрагировали хлороформом (18 ч, затем 2 ч). Хлороформные экстракты отгоняли на испарителе при 30° С, осадок растворяли в хлороформе (в 5 мл). Полученный экстракт содержал только липидные вещества. Хроматографию проводили на пластинках в системах для полярных и неполярных-липидов. Липиды идентифицировали сравнением величин их R_f с R_f свидетелей и проявителей. R_f данного вещества характеризует скорость его перемещения на хроматограмме - это отношение от стартовой линии хроматограммы до центра пятна в любой момент времени к расстоянию, пройденному за это время растворителем. Хроматограммы липидных экстрактов среды проявляли 5% фосфомолибденовой кислотой, напрогревали при 105°С, денситометрировали на денситометре ERI-65 и определяли процентное содержание классов липидов по площади их пиков на денситограмме. Хроматографирование СЖК проводили в системе для неполярных липидов (петролейный эфир-этиловый эфир-уксусная кислота - 80:20:1), СЖК элюировали смесью хлороформ-изопропанол - 1:1, элюат фильтровали, отгоняли на испарителе, взвешивали и переносили в ацетон. Гидролиз липидов и этерификация. ЖК проводили 0,5 N раствором NaOH в метаноле и 14 % раствором BF₃ в метаноле соответственно. Определение состава ЖК проводили методом газо-жидкостной хроматографии. Фаза - бутандиол-сукцинат на хромосорбе зернением 0,120-0,160 мм. Температура колонки 190° в режиме программирования, температура детектора 220°. Длина колонки 1,5 м. Идентификацию ЖК проводили по стандартной смеси эфиров ЖК с внутренним стандартом (15:0). Структуру ЖК дополнительными методами не определяли.

Концентрацию перекисных продуктов в средах водоросли определяли по малоновому диальдегиду (МДА). К 1 мл среды добавляли 2 мл насыщенного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%) и нагревали 10 мин. на кипящей водяной бане. Затем определяли оптическую плотность образцов при 535 и 600 нм. Коэффициент экстинкции МДА при 535 нм составляет $156 \text{ Ю}^3 \text{ М}^{-1}$. Концентрацию МДА (С) рассчитывали по формуле $C = (E_{535} - E_{600}) / 156 \cdot 10^3$.

Альгицидную активность культуральной среды и экстрактов из нее изучали, используя в качестве тест-объектов культуру водоросли-продуцента - *Chlorella. pyrenoidosa* Chick. S-39 и *S. quadricauda* (Тиф.) Kutz. Водоросли

предварительно в течение 7 сут. подращивали в оптимальных условиях, в колбах на 50 мл и далее использовали как посевной материал для опытов. Испытываемые экстракты и среду - по 0,2 мл вносили в пробирки, затем тестируемые водоросли - 10 мл в каждую пробирку. В качестве контроля использовали пробирки со свежей культуральной средой. Опыты проводили в 3-х биологических повторностях. Опытные пробирки помещали в условия, идентичные условиям предварительного подращивания, но без барботажа) и ежедневно встряхивали. Результаты воздействия сред и экстрактов оценивали подсчетом численности клеток через 7 сут. Изучение роста и функционального состояния культуры водоросли *Chlorella. pyrenoidosa* на культуральных средах, на которых выращивали ту же культуру в течение 1-14 сут. проводили с целью определить влияние накопленных в средах метаболитов на фотосинтетические характеристики водоросли. Пробы водоросли отбирали на 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сут. В пробах определяли численность клеток и характеристики быстрой флуоресценции хлорофилла. Контроль за возможным обеднением сред проводили по азоту. Нитраты определяли стандартным методом.

При оценке бактерицидной активности культуральных сред и экстрактов из них в качестве тест-объектов использовали культуры микроорганизмов. Микроорганизмы выращивали, затем готовили исходные суспензии тест-объекта в воде (5-10 ед. мутности по стандарту). Далее исходную суспензию вносили в расплавленные и охлажденные до 45°C агаризованные среды (1 мл на 100 мл среды), которые стерильно разливали в чашки Петри (по 10 мл). Полученные таким образом чашки со средой, засеянной тест-объектами, использовали для определения бактерицидной активности сред водоросли и экстрактов методом дисков. Для этого из фильтровальной бумаги вырезали диски диаметром 6,5 см и пропитывали экстрактами или испытуемой средой (по 0,3-0,5 мл). Диски помещали на чашки с засеянной культурой и наблюдали 1-5 сут. размер зоны угнетения развития микроорганизмов (диаметр), который выражали в см за минусом диаметра диска. Каждый вариант опыта ставили в 3-х повторностях, в контроле диски пропитывали эквивалентным количеством соответствующего растворителя или среды. Антибактериальную активность проверяли для всех культур на свету (24 Вт/м общего света от ламп ЛБ-40) и в темноте при pH 5,0; 7,0; 8,5. Препараты ЖК, в опытах использовали в виде солей аммония, для чего растворяли в аммиачной воде.

Эксперименты проводились в 3-5 повторностях. Данные представлены с определением ошибки репрезентативности выборочной средней для малых выборок и 5% уровня значимости. На графиках и копиях кинетических кривых представлены типичные для опытов зависимости. При обработке данных использовали программу «Microsoft Excel»

3.3. Технология производства и получения суспензии *Chlorella*

Производство суспензии *Chlorella* основано на фотосинтезе микроводорослей, который осуществляется в емкости, с использованием искусственного освещения и раствора углекислого газа.

Процесс производства непрерывный, при котором из емкости ежедневно сливается часть объема суспензии клеток микроводорослей, которая идет на выпашивание животным. Воспроизводство *Chlorella* осуществляется в питательном растворе, приготовленном по специальному рецепту.

Культивирование *Chlorella* ведется круглый год. Продуктивность ее не зависит от сезона года.

Культиватор *Chlorella* КХ-60 представляет собой модульную установку с производительностью суспензии *Chlorella* 60 литров в сутки и плотностью клеток 50-60 млн/мл.

Наращивание объема суспензии *Chlorella* достигается увеличением количества установок. Так, например 2 установки – 120 литров, 3 установки – 180 литров, 4 установки – 240 литров и т.д.

Культиватор *Chlorella* КХ-60 состоит из одной емкости, двух светильников в стеклянных колпаках и сетчатой крышки.

Производство суспензии *Chlorella* включает следующие стадии:

- в емкость с питательной средой вводят маточную культуру *Chlorella* (поставляется готовой);
- ежедневно в емкость вливают раствор углекислого газа;
- через четыре дня суспензия *Chlorella* готова к использованию;
- процесс выращивания микроводорослей, слив части готовой суспензии *Chlorella* и розлив питательного раствора осуществляется ежедневно.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Накопление внеклеточных органических веществ в культуре микроводорослей.

Опыты по изучению накопления ВОВ в культурах водоросли *Chlorella pyrenoidosa* показали, что увеличение количества ВОВ происходило в соответствии с ростом численности клеток и к концу опыта составляло величину 580-620 мг/л. В начале, в частности на временном интервале 1-5 сут. содержание мертвых клеток не превышало 3-5%. Накопление органики в среде в это время происходило с высокой скоростью. Можно допустить, что источником ее в это время являются живые клетки водорослей.

Наиболее важным является вопрос о возможностях клеток водорослей к прижизненному выделению органических веществ, что тесно связано с гетерогенностью структуры популяции клеток по физиологическому состоянию, с критериями определения живых и мертвых клеток. Оценка прироста ВОВ отношению к приросту биомассы для *Chlorella pyrenoidosa* S-39 в оптимальных условиях в начале кривой роста показала, что возможная величина прижизненных выделений ВОВ клетками культуры составляет 3,9-5,1% по отношению прироста ВОВ к приросту биомассы (табл.2).

Таблица 2. Продуцирование ВОВ водорослью *Chlorella pyrenoidosa* S-39 в начале кривой роста. Доверительный интервал (1)/(2) 0,040-0,050 (4-5%) для 5% уровня значимости

Опыт, №	Сутки развития культуры	Прирост ВОВ, мг(1)	Прирост биомассы, мг (2)	Отношение (1)/(2)
1	1-5	55,5	1260	0,049
2	1-5	74,0	1918,0	0,039
3	1-5	364,8	7278,0	0,050
4	1-5	100,0	1791,0	0,056
5	1-5	123,0	2411,0	0,051

Фотосинтетическая активность культуры *Chlorella pyrenoidosa* S-39 оценивалась по эффективности функционирования фотосистемы 2. Относительный выход переменной флуоресценции (F_v/F_m), который отражает активность ФС 2 и скорость фотоиндуцированного выделения кислорода (СВК) была максимальной на 3-5 сут. развития культуры и затем монотонно снижалась.

Такие расчеты представляются возможными поскольку процент мертвых клеток не превышал 3-5%, культура находилась в состоянии высокого уровня активности роста, фотосинтеза и жизнеспособности. Значительный вклад в формирование РОВ среды в начале развития культуры вносят продукты материнских клеток, высвобождающиеся при выходе апланоспор (Nalewaiko, 1966). Если принять во внимание мнение авторов, считающих основным источником внеклеточных органических веществ продукты автолиза (Хайлов, 1974; Денисова, 1978), тогда на протяжении всего опыта должно наблюдаться соответствие между накоплением мертвых клеток и органического вещества среды, чего не наблюдалось.

4.2. Состояние культуры водоросли *Clorella pyrenoidosa* по результатам электроспектроскопии и процессы выделения внеклеточных органических веществ

В зависимости от физиологического состояния клеток водоросли в процессе развития накопительной культуры, выделение органических веществ на разных стадиях роста происходит неравномерно, и тесно связано с функциональным состоянием клеток [26], количеством мертвых клеток, соотношением процессов активного выделения (истинно прижизненного и постлетального).

Однако, в связи с неоднородностью структуры популяции водоросли по функциональному состоянию (Погосян и др., 1991) трудно учесть органическое вещество, выделяемое ослабленными клетками, клетками живыми, но с нарушенной проницаемостью внешних мембран. В связи с этим, в накоплении ВОВ возрастает роль пассивной диффузии органического вещества из клеток во внешнюю среду. Определение доли прижизненных выделений ВОВ таким образом, усложняется.

Таблица 3. Общая характеристика культуры *Chlorella. pyrenoidosa* и накопление внеклеточных продуктов в 14-сут. опытах. Число опытов - 3. В каждом опыте - усредненная проба из 3 сосудов

Время, сутки	РОВ среды, мг/л	Биомасса, мг/л	Количество Клеток, млн/мл	РОВ/ биомасса, %
3	75 ±4,5	1 600 ±7	155±11	4,4
5	160 ±6,4	4 330 ±24	457 ± 21	3,6
7	270±11	7 720 ± 38	808 ± 37	3,4
11	520 ±8	11470 ±40	843±37	4,5
14	600 ±11	12 200 ±46	790 ± 27	5,1

В 1 - 3 сут. скорость роста не максимальна, % мертвых клеток мал, активность фотосинтеза (скорость выделения кислорода и активность фотосистемы 2) растет, выделение органики происходит в основном прижизненно, то есть, живыми клетками, вклад погибших клеток мал и им можно пренебречь, но процесс накопления РОВ продолжается как и рост численности клеток и соответственно их суммарной биомассе. К 3-5 сут. развития достигается максимальная активность фотосинтеза, накопление в среде органики резко увеличено за счет прижизненных выделений, поскольку мертвых клеток мало (по окрашиванию). На 3 сут. процент живых клеток, определенный при помощи метода электроспектроскопии не являлся максимальным и уже составлял лишь около 75 % (табл. 4) , что означает

наличие в суспензии клеток, функционально ослабленных, но не мертвых. В период 5-7 сут. (фаза экспоненциального роста) продолжается интенсивный рост численности клеток и накопление органики в среде. Количество мертвых клеток по методу окрашивания - около 9%. Активность фотосинтеза снизилась, но она достаточна для поддержания темпов роста культуры. По электрическим параметрам число живых уже существенно уменьшилось, очевидно, за счет уменьшения доли клеток, способных к активному транспорту и возрастания доли клеток, функционально менее активных, но с преобладанием роли пассивной проницаемости. Такие клетки в первую очередь гибнут, но на данный момент времени их нельзя считать мертвыми. Доля ВОВ, выделяемого клетками, с нарушенными барьерными свойствами мембран довольно высока и становится преобладающей к 10 сут., а к 14 сут. лишь 34% клеток можно считать функционально живыми, тогда как по методу окрашивания в культуре до 70% живых клеток (табл. 4).

Таблица 4. Состояние культуры *Chlorella pyrenoidosa* и накопление внеклеточных продуктов в 14-сут. опытах. Приведены средние значения. Число опытов - 3. В каждом опыте - усредненная проба из 3 сосудов

Время, сутки	Активность ФС2, отн.ед.	% живых клеток, (окрашивание)	% живых клеток	РОВ среды, мг/л
3	0,9	98,5	73,6	75,0
5	0,75	95,0	67,5	160,0
7	0,70	91,0	51	270,0
11	0,25	80,0	37,7	520,0
14	0,20	70,0	34	600,0

Электроспектроскопический метод измерения % содержания клеток в их суспензии основан на следующем принципе. Любую клетку можно представить как структуру, внутри которой находится проводящая жидкость (внутриклеточное содержимое) и в свою очередь окруженную проводящей жидкостью (межклеточной средой). Таким образом, получается система из двух проводящих жидкостей (внутри- и внеклеточные), разделенных изолятором - мембраной. В обобщенном виде суспензия клеток рассматривается как гетерогенная система, состоящую из обладающей электрическим сопротивлением R_s дисперсионной среды и непроводящей дисперсной фазы. Если рассматривать мембрану в качестве идеального диэлектрика, т.е. полностью непроницаемую, то в этом случае она обладает определенной емкостью, или мембранной емкостью C_m . Однако, мембрана клетки не является совершенным изолятором и через нее, в результате пассивного и активного транспорта из клетки и внутрь ее проникают ионы, т.е. она обладает ионной проницаемостью. Поскольку постоянный

электрический ток через клетку не проходит и происходит только однонаправленное, в зависимости от знака поля, перемещение зарядов вне и внутри клетки (поляризация), измерения проводят в переменных электрических полях.

В переменном электрическом поле низкой частоты характеристикой величины ионной проницаемости мембраны является активное сопротивление R_s . Существует три общих пути, по которым переменный электрический ток проходит через суспензию клеток: а) через межклеточную жидкость, б) через межклеточную жидкость к клетке, затем через мембрану клетки благодаря ее проводимости (ионной проницаемости), через внутриклеточную жидкость, сквозь мембрану противоположной стороны и далее снова через межклеточную жидкость, в) через межклеточную жидкость к клетке, затем через мембрану клетки благодаря ее емкости (ионной непроницаемости), через внутриклеточную жидкость, сквозь мембрану противоположной стороны и далее снова через межклеточную жидкость. Каждый из путей прохождения электрического тока через суспензию клеток в зависимости от его частоты имеет свою специфику.

На низких частотах (от единиц Гц до 1 кГц) суспензия клеток водорослей в проводящей жидкости представляет собой суспензию непроводящих шарообразных включений (поскольку сопротивление мембраны R_m очень высокое), которые увеличивают электрическое сопротивление, R_s суспензии пропорционально их концентрации. Расчет электрической проводимости суспензии с непроводящими шарообразными включениями и его экспериментальная проверка позволили Н.Фрике [52] предложить упрощенную формулу, используемую в практических целях:

$$\frac{R_0}{R_s} = \frac{2(1 - \Phi)}{2 + \Phi}, \quad (16)$$

где R_0 , - сопротивление суспендирующей среды (межклеточной жидкости),

R_s - сопротивление суспензии клеток и Φ — относительный объём, занятый взвешенными клетками, или объемный индекс. Наиболее оптимальной для измерения частотой является 1 кГц, поскольку на более низких частотах начинает играть роль поверхностная проводимость клетки, а с увеличением частоты мембрана клетки перестает быть изолятором и в измеряемые величины включается внутриклеточное сопротивление R_i . Таким образом, определенный электрической проводимости относительный объём клеток в суспензии отражает объемную концентрацию клеток с той ионной проницаемостью, которая характерна для живых клеток. В процессе отмирания ионная проницаемость клеток нарушается, что приводит к снижению величины объемного индекса "живых" клеток, хотя морфологическая целостность клетки может и сохраняться, следствием чего является расхождение в определении электроспектроскопическим методом и, например, с использованием витальных красителей (рис. 1).

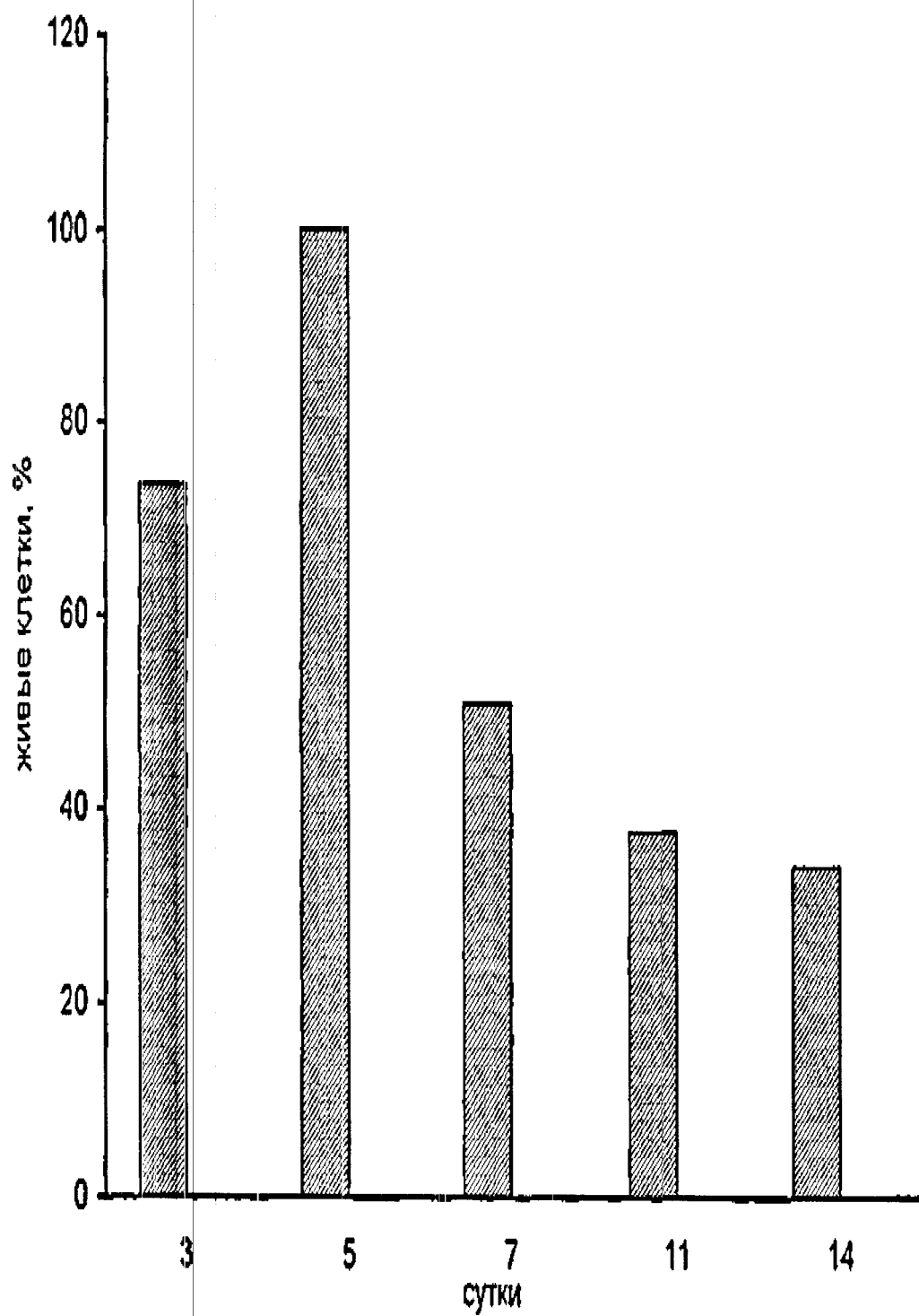


Рис. 1 . Изменение количества (%) живых клеток в культуре водоросли *C.pyrenoidosa* S-39 (по электрическим параметрам суспензии).

На частоте 10 МГц электрические параметры суспензии клеток определяются соотношением между числом проникающих через мембрану ионов и непроникающих, которые концентрируются по обе стороны мембраны. Если доля свободно проникающих ионов связано с процессами пассивной проницаемости, то число непроникающих ионов определяется работой систем активного транспорта клетки. Для определения соотношения между ионами проникающими и непроникающими через мембрану, используется методический прием, известный как метод Рейнбаха-Слюйтерса, широко применяющийся в электрохимии для анализа обратимости и необратимости в электрохимических реакциях.

Рост и развитие клеток водорослей сопровождается изменением как активных, так и пассивных транспортных процессов через мембрану клеток, причем в определенные сутки культивирования активный перенос ионов преобладает над пассивной проницаемостью. Так происходит на 5-7 сут, тогда как на 3 и 11 сут уровень функционирования активных транспортных процессов минимален. Это свидетельствует об увеличении числа жизнеспособных клеток в культуре на 5-7 сут, что также подтверждается максимальными значениями в эти сроки коэффициента поляризации (жизнеспособности) K_p . Соотношение активных, и пассивных транспортных процессов через мембрану клеток водорослей в процессе роста культуры меняется, о чем свидетельствуют изменения в сопротивлении межклеточной жидкости R_0 и внутреннего сопротивления клетки R_i (рис.2).

На 5-7 сут. культивирования пассивная проницаемость мембран клеток водорослей и, следовательно, накопление в межклеточной среде РОВ минимально, по отношению к 3 и 11 сут, где в результате накопления в культуре нежизнеспособных клеток с повышенной пассивной проницаемостью увеличивается сопротивление межклеточной среды R_0 в результате выхода в нее вместе с РОВ внутриклеточных ионов. Вместе с тем, в период роста культуры с 3 по 5 сут наблюдается обратный процесс: активный рост клеток сопровождается их повышенной метаболической активностью, в результате чего происходит интенсивное накопление питательных веществ из окружающей среды, в том числе и ионов, находящее отражение в снижении сопротивления межклеточной среды R_0 , и одновременном росте R_i .

В период 7-11 сут. роста число функционально мертвых клеток (с возросшей пассивной проницаемостью) увеличивалось (рис.1) как и мертвых клеток, определяемых методом окрашивания. Доля живых клеток по электрическим показателям в этот период значительно ниже, чем по методу окрашивания. На фоне дальнейшего снижения активности фотосинтеза и K поляризации 14 сут. - начало фазы отмирания, когда все исследованные функциональные параметры достигают своих минимальных значений, а накопление ВОВ происходит, в основном, за счет автолиза клеток и пассивной проницаемости функционально мертвых клеток. Изменения основных параметров, определяющие функциональное состояние культуры *Chlorella pyrenoidosa* в процессе развития (14-сут. опыт) показаны в табл. 5.

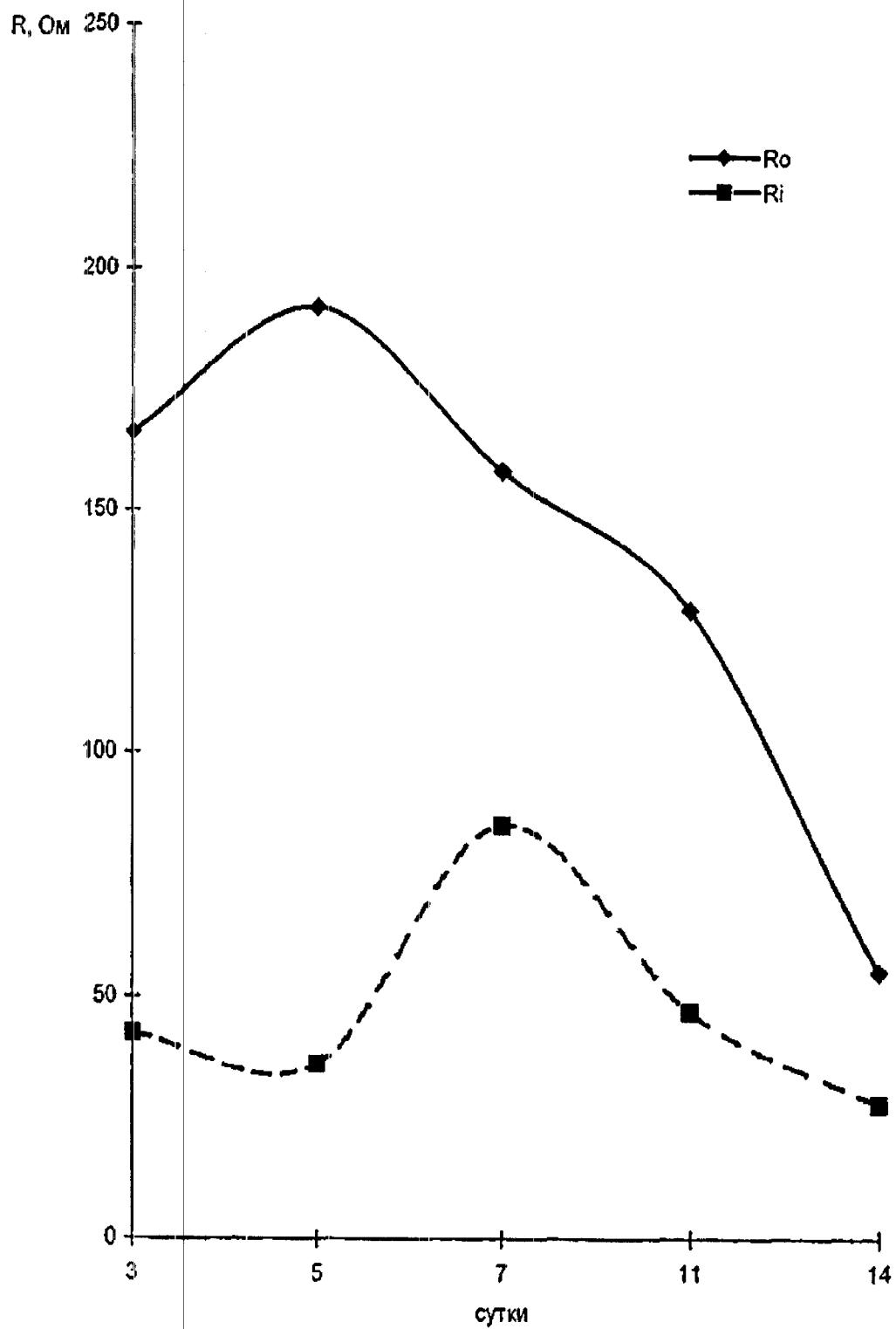


Рис. 2 Динамика сопротивления внутреннего содержимого (R_i) и наружной среды (R_0) клеток культуры водоросли *C.pyrenoidosa* S-39 в процессе роста

Данные таблицы представлены в процентах, (за 100% принимали максимальные значения показателей состояния культуры, наблюдаемые в процессе развития культуры).

Опираясь на исследование функционального состояния культуры *Chlorella pyrenoidosa* S-39 можно полагать, что до 7 сут. развития в условиях 14-сут. наблюдений в накоплении ВОВ определяющее значение имеют процессы прижизненного выделения, которое происходит почти линейно. После 7 сут. процесс накопления ВОВ продолжается, причем с ускорением, очевидно за счет вклада в накопление биомассы лизировавших клеток, а также органики, выделяющейся функционально мертвыми клетками с мембранами, утратившими свои барьерные функции (рис.3). Изменения активности фотосинтеза и энергозависимых параметров в это время имели сходный характер с максимумом на 5 сут. (изменения активности ФС 2, величины R_s , отражающего проницаемость и α - параметра, зависящего от уровня метаболизма клеток), что подтверждает высказанное выше положение.

Таблица 5. Изменения основных параметров, определяющие функциональное состояние культуры *Chlorella pyrenoidosa* в процессе развития (14-сут. опыт)

Время, сут.	Активность ФС 2, %	K_n , %	РОВ среды, %	R_s (1 кГц), %	α параметр, %
3	55	48	12,5	60	83
5	88	70	32	100	100
7	80	100	45	73	93
11	78	59	87	55	61
14	32	43	100	26	85

Определение % живых клеток по данным электроспектроскопии (рис.4) показало существенные отличия от данных, полученных методом окрашивания. В экспоненциальной фазе роста живых клеток оказалось на 25% меньше, а после 7 сут. роста различия увеличивались до 50%.

Это свидетельствует в пользу более сложного характера гетерогенности структуры популяции водоросли *Chlorella pyrenoidosa*, который определяется в значительной степени функциональным состоянием клеток, в частности, барьерными свойствами внешних мембран клеток. С ростом культуры усредненная жизнеспособность клеток снижается, растет количество мертвых и функционально мертвых клеток, кривая роста численности наиболее сходна с кривой накопления ВОВ (рис.5).

Следует отметить, что нет соответствия между изменениями фотосинтетической активности и количеством мертвых клеток в развивающейся культуре (рис.4).

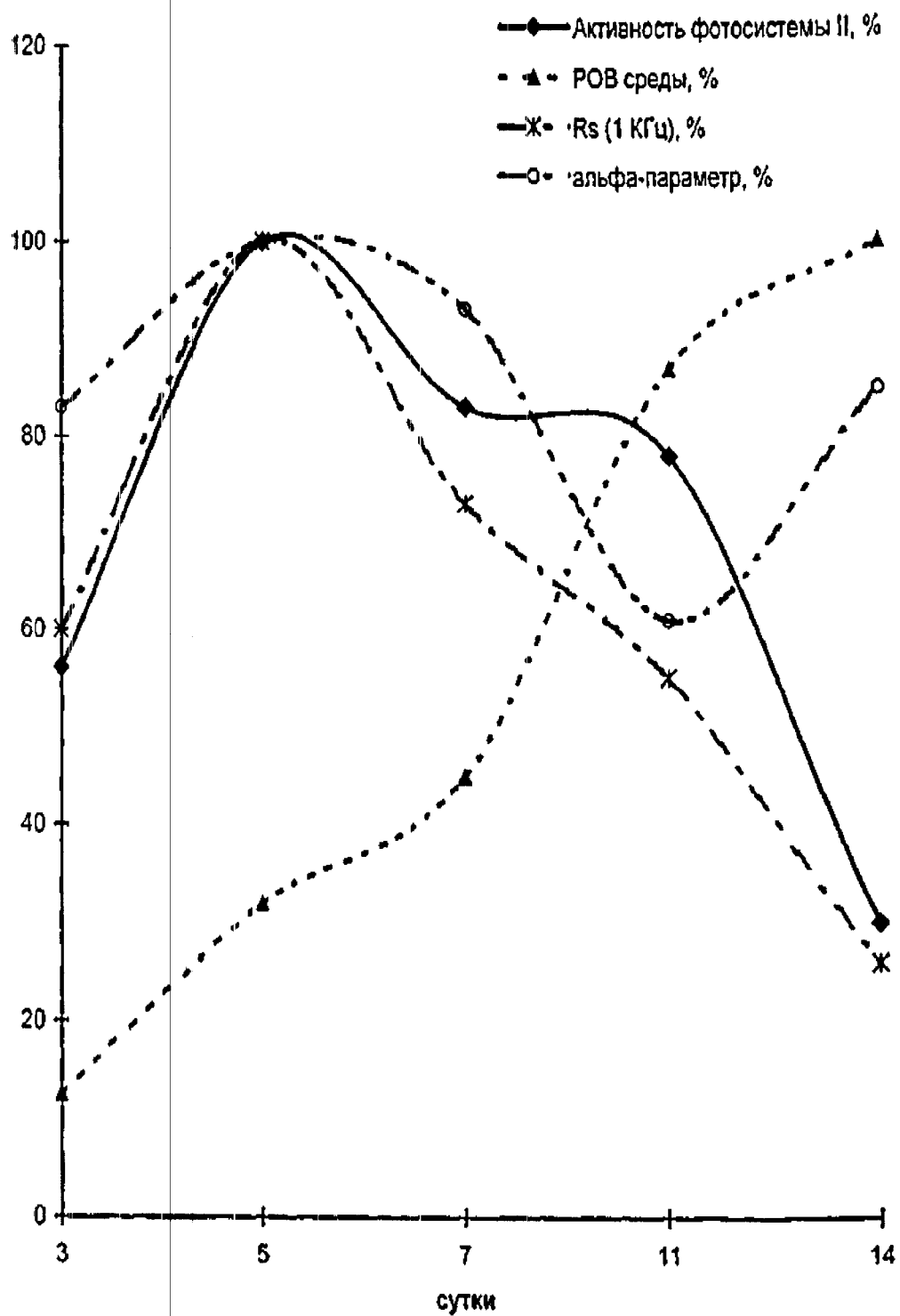


Рис. 3 Динамика накопления органических веществ в среде культуры *Chlorella. pyrenoidosa*, активности ФС2 и энергозависимых параметров клеток водоросли, в % от максимальных значений.

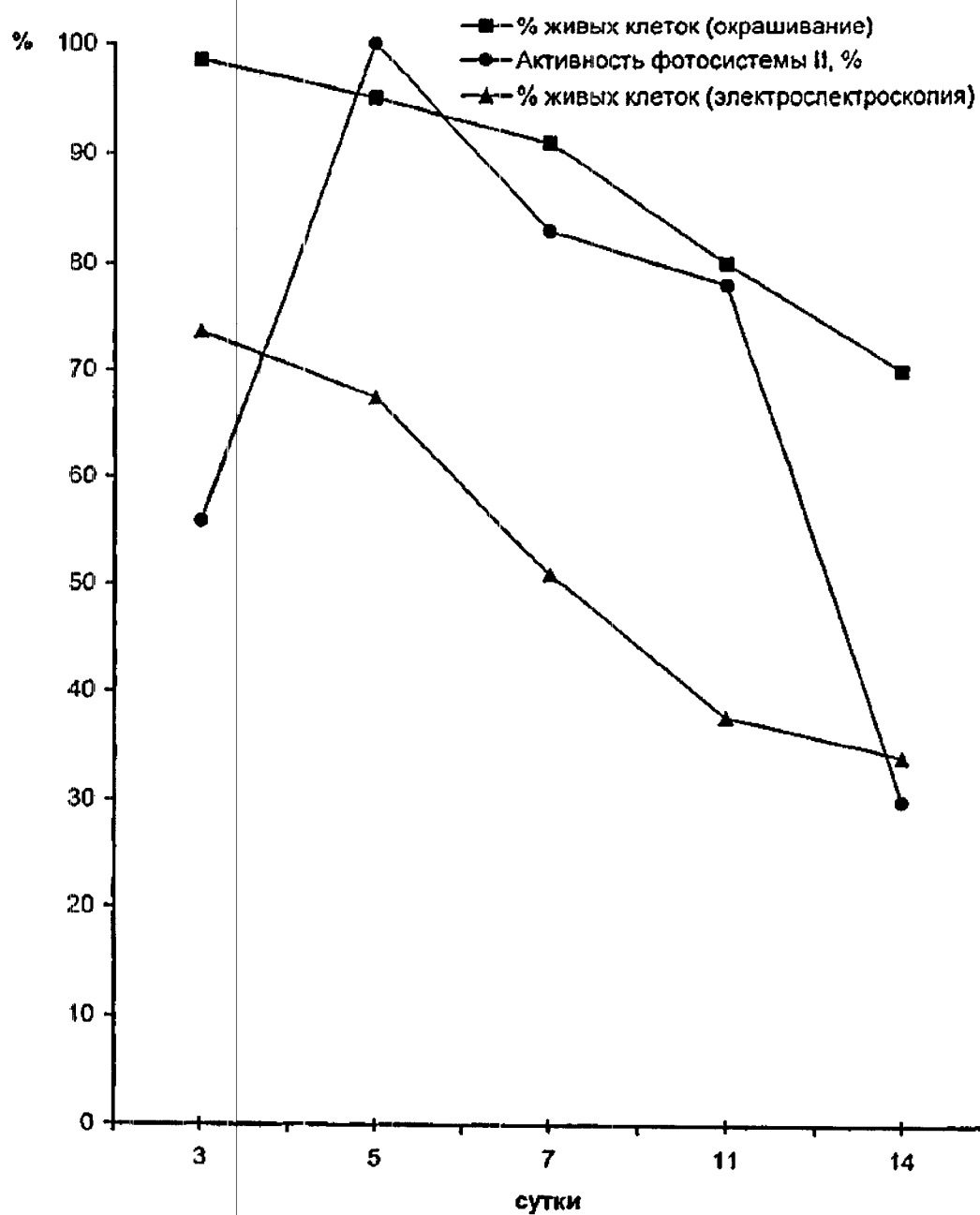


Рис.4 Динамика живых клеток (окрашивание), определяемых по данным электропроводимости на частоте 1 Гц в процессе развития культуры *Chlorella pyrenoidosa* в % от максимальных для опыта значений.

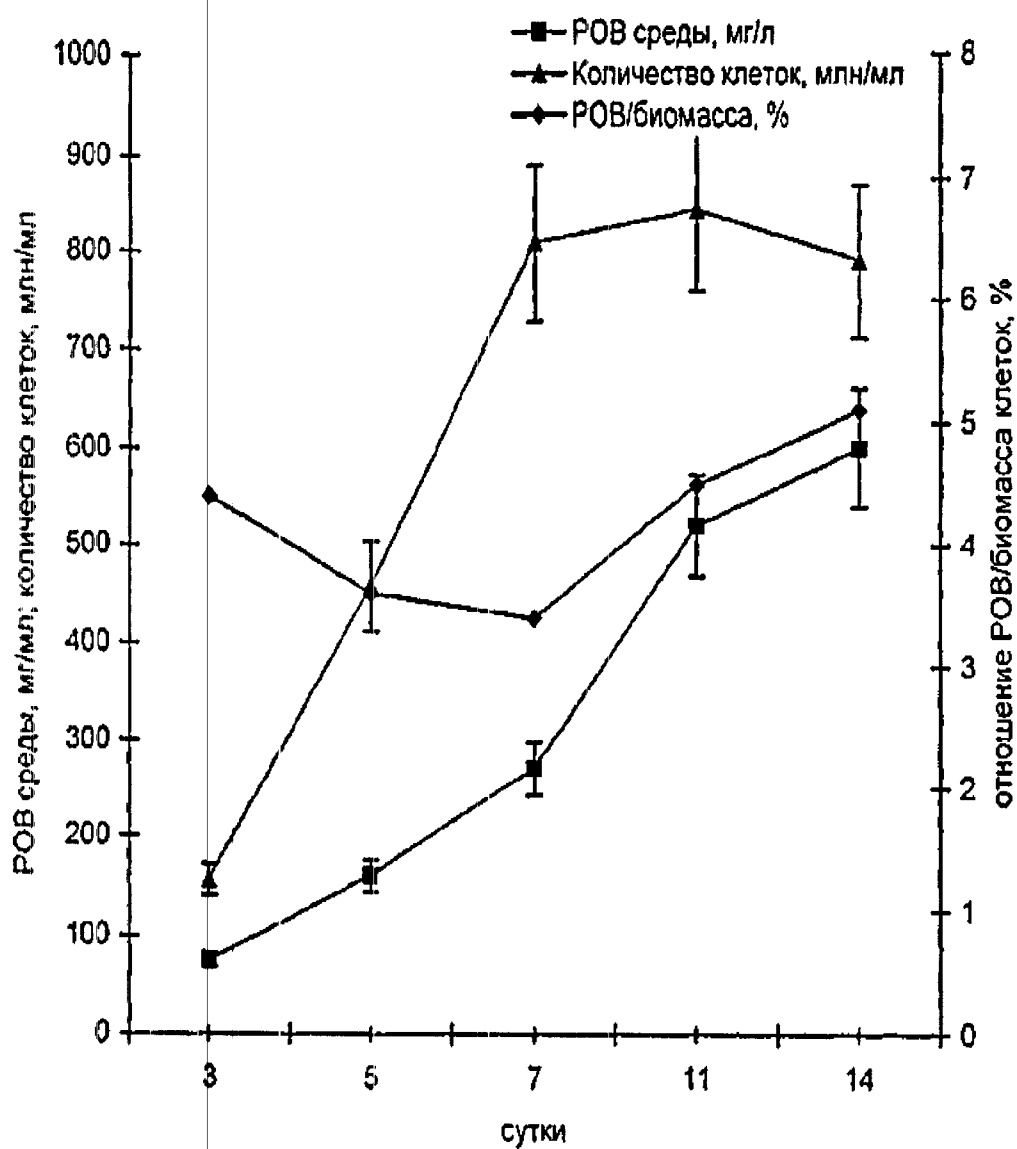


Рис. 5. Общий характер процесса накопления органических веществ в среде *Chlorella. pyrenoidosa* S-39 и численности клеток в 14-сут. опыте.

Особенно заметно несоответствие между этими показателями в начале и конце кривой роста (1-3 и 11-14 сут.). В период 5-11 сут. снижение активности ФС 2 сопровождается снижением числа живых клеток (увеличением числа мертвых) независимо от способа определения. Накопление ВОВ за счет выделений функционально мертвыми клетками (электроспектроскопия) в начале кривой роста и далее существенно, судя по высокому содержанию таких клеток в культуре. Простое суммирование ВОВ, сформированного мертвыми клетками, определяемыми разными способами неуместно, однако полученные данные свидетельствуют, что доля истинно прижизненных выделений ВОВ в начале кривой роста или по крайней мере до 7 сут. связана с функциональным состоянием внешних мембран клеток и, строго говоря ниже, чем определяемое с учетом мертвых клеток рутинным способом. Следовательно, при учете ВОВ необходимо принимать во внимание функциональное состояние клеток, что позволит надежнее и точнее оценивать внеклеточную продукцию водорослей, а также регулировать биотехнологические циклы с использованием культур микроводорослей.

В период, когда происходит снижение эффективности функционирования фотосинтетического аппарата клеток, что может быть связано смещением гетерогенности культуры по физиологическому состоянию клеток в пользу ослабленных клеток или поврежденных, наблюдается рост электрических потерь на внешних мембранах (положение минимума тангенса электрических потерь, коэффициента поляризации, снижение уровня метаболизма). После 7 сут. развития наблюдается существенное увеличение пассивной проницаемости на фоне снижения уровня функционирования активного транспорта, а также по снижению сопротивления внутреннего содержимого клеток. Существенно, что в этот период - после 7 сут. резко увеличивается скорость накопления ВОВ в культуральной среде. К концу наблюдений - 14 сут. в накоплении ВОВ большое значение приобретает переход в состав органического вещества среды биомассы клеток после автолиза.

Можно предположить, что органические вещества именно прижизненного происхождения имеют высокую физиологическую активность и могут регулировать как рост и развитие культур водорослей-продуцентов, так и влиять на сопутствующие организмы в лабораторных или естественных условиях, что крайне существенно при решении задач продукционной гидробиологии или биотехнологии при получении отдельных ценных продуктов водорослей из состава ВОВ, а также в условиях нестерильного или совместного культивирования водорослей.

Развитие микроводорослей сопровождается постепенным накоплением в среде растворенных органических веществ (РОВ или ВОВ) [27]. В фильтрах

водорослей обнаружены белки, липиды, аминокислоты, фенольные соединения, углеводы, гормоны, антибиотики, органические кислоты и другие [19,32]. Принято считать, что внеклеточные вещества поступают во внешнюю среду в результате жизнедеятельности активно растущих культур и в результате отмирания клеток [30]. Некоторые группы соединений из состава ВОВ обладают физиологической активностью и могут быть регуляторами роста и развития как по отношению к самим продуцентам, так и к другим организмам, в частности к бактериям. К таким функционально активным соединениям относят внеклеточные липиды и фенолы, тогда как продукты углеводного и азотного обмена считают функционально неспециализированными в физиологическом или биохимическом отношении [10,34].

Наиболее распространенными типами отношений между водорослями и бактериями являются синергизм и антагонизм. Антагонизм характеризуется резким уменьшением численности бактерий, вплоть до полного их исчезновения, в периоды интенсивного развития фитопланктона. В сильно загрязненных органическими стоками водах при обильном развитии гетеротрофных микроорганизмов может происходить подавление развития фототрофных организмов [22]. Поэтому способность водорослей подавлять развитие бактерий открывает возможность регулировать этот процесс, что имеет важное практическое значение при культивировании водорослей в нестерильных условиях для целей биотехнологии или аквакультуры. Способность водорослей выделять вещества, являющиеся активными по отношению к самим продуцентам или другим водорослям свидетельствует о значении внеклеточных метаболитов в регуляции процессов роста и развития как продуцентов, так и сопутствующих видов при совместном культивировании или в естественных условиях.

При выяснении причин гибели бактерий в растущих культурах водорослей полагали, что свет лишь обеспечивает условия для быстрого роста фототрофов, что приводит к изменению физико-химических условий среды, что делает ее непригодной для роста микроорганизмов. Ранее было установлено, что действительно при росте культур водорослей, особенно в начале кривой роста происходит резкое снижение окислительно-восстановительного потенциала и величины рН [26]. Однако в дальнейшем было высказано предположение, что, свет может инициировать образование веществ, обладающих антибактериальной активностью из неактивных предшественников. При этом имели в виду фотохимические дериваты хлорофиллидов при активном росте и свободные жирные кислоты (СЖК) в период отмирания культур водорослей [22]. Кроме того было показано в природных условиях на Мазурских озерах, что свет не является фактором, прямо ингибирующим развитие бактерий.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Водоросли - одни из древнейших организмов, населяющих нашу планету. Пожалуй, только бактерии могут поспорить с ними в древности происхождения и длительности существования. В прошлые геологические эпохи, как и в настоящее время, водоросли населяли океаны, реки, озёра и другие водоёмы. Обогатив атмосферу кислородом, они вызвали к жизни мир разнообразных животных и способствовали развитию аэробных бактерий; они явились родоначальниками растений, заселивших сушу, и как это не удивительно, создали могучие толщи горных пород. В воде и на суше, в снегах, льдах и горячих источниках, по всему земному шару - от просторов Северного Ледовитого океана и его островов, до тропиков, и от тропиков до снегов и скал Антарктиды, от морских глубин до высоких гор - всюду мы находим водоросли. Их микроскопические размеры способствуют переносу на большие расстояния. Водные течения разносят их по морям и океанам. Такую же роль выполняют рыбы, особенно проходные. Выброшенные из воды на берег и высохшие, подхваченные с илом и пылью с поверхности скал и почвы ветром и птицами - водоросли переносятся на большие расстояния. Пути и способы распространения водорослей исключительно многообразны и полностью обеспечивают их повсеместное разнесение.

Наиболее общим выражением их является распределение водорослей по широтным зонам: в тёплых тропических морях, где условия более благоприятны, мы находим и большее количество видов; в холодных арктических морях флора водорослей по видовому составу значительно беднее.

Распространённые по всему земному шару, водоросли, несомненно, должны играть значительную роль в жизни природы. На первый взгляд водоросли малозаметны и роль их кажется незначительной, и только в исключительных случаях, как, например, в густых зарослях морских макрофитов или при "цветении" воды, вызываемом планктонными водорослями, они поражают своим изобилием. Произведённые подсчёты показывают, что в масштабе всей Земли роль водорослей в общем балансе живого вещества оказывается поистине огромной.

Основное значение водорослей в жизни природы вытекает из их физиологических особенностей как зелёных растений: подобно высшим зелёным растениям на суше, водоросли в воде являются основным созидателем органического вещества. Таким образом, можно сказать, что весь остальной мир современных живых существ воды в той или иной мере обязан своим существованием водорослям, так как водоросли, благодаря содержанию в них хлорофилла, способны созидать органические вещества своего тела из неорганических веществ

окружающей их воды. Следовательно, они являются в воде производителями той первопищи, которой в дальнейшем пользуются все остальные лишённые хлорофилла водные организмы.

Огромное значение имеет также то обстоятельство, что водоросли в процессе фотосинтеза выделяют свободный кислород, необходимый для дыхания водных организмов, как животных, так и растительных.

Содержание углекислого газа в воздухе быстро растёт, что беспокоит не только ученых, но и простых обывателей, озабоченных состоянием окружающей среды. Они боятся глобального потепления и призывают сократить выбросы CO_2 в атмосферу. Но куда же его девать? Ученые из Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и Академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова предлагают использовать его для выращивания одноклеточных водорослей, например хлореллы, с определенным биохимическим составом. Эти водоросли можно будет использовать для производства соединений, представляющих коммерческий интерес. Углекислота – не только парниковый газ. От его содержания в атмосфере зависит интенсивность фотосинтеза, и ученых беспокоит, какова она будет, если климат изменится. При нынешней концентрации CO_2 в атмосфере (0, 03%) фотосинтез многих растений замедлен; оптимальное содержание для разных видов растений различно, но в среднем в 60-70 раз выше. Слишком много углекислого газа – тоже плохо. При концентрации 10-25% фотосинтез замедляется и может даже полностью прекратиться.

Но существуют растения, в частности одноклеточные водоросли, устойчивые к высоким концентрациям CO_2 .

Недавно российские ученые обнаружили в коллекции культур микроводорослей Института физиологии растений РАН два штамма (*Chlorella vulgaris* и *Galdieria partita*), способные расти даже в чистом диоксиде углерода. Эти водоросли испытали в лаборатории, предложив им более мягкие условия – атмосферу состоящую из CO_2 на 5% . Оказалось, что при такой концентрации водоросли достаточно активно растут, но их биохимический состав отличается от нормального: в клетках меньше белков, вероятно, больше крахмала, другой состав липидов. Изменение биохимического состава привлекает особое внимание биотехнологов. Высокая концентрация диоксида углерода – стресс для клетки. При этом разные виды производят и накапливают неспецифичные для них вещества, в том числе представляющие коммерческий интерес, например каротиноиды, некоторые углеводы и жирные кислоты. Если обмен веществ одноклеточных водорослей при высоких концентрациях углекислого газа удастся в широких масштабах поставить на службу человечеству, вскоре выбросы диоксида углерода не будут поступать в атмосферу, а пойдут на выращивание биомассы микроводорослей с определенным биохимическим составом.

Проведенные в работе исследования показали, что в процессе развития накопительной культуры *Chlorella pyrenoidosa* выделение органических веществ на разных стадиях роста происходит неравномерно и тесно связано с функциональным состоянием клеток, соотношением процессов прижизненного и постлетающего выделения. В связи с неоднородностью структуры популяции водоросли по функциональному состоянию, трудно учесть ВОВ, выделяемое клетками живыми, но с нарушенной проницаемостью внешних мембран, в накоплении ВОВ возрастает роль пассивной диффузии органических веществ. Накопление ВОВ в культуральной среде водорослей сопровождалось значительными изменениями фотосинтетической активности культуры *C. pyrenoidosa* S-39. В экспоненциальной фазе максимальная фотосинтетическая активность культуры водоросли, величина коэффициента поляризации, R_s , отражающего проницаемость и α -параметра, зависящего от уровня метаболизма клеток совпадала со скоростью роста и скоростью накопления ВОВ. Накопление ВОВ на фоне снижения фотосинтетической активности и K_n в линейную и в начале стационарной фазы развития культуры объясняется увеличением доли клеток с низкой функциональной активностью -функционально мертвых (по электрической проводимости на низких частотах.). В это время в процессе выделения ВОВ увеличивается роль пассивной диффузии в связи с увеличением проницаемости мембран клеток, судя по электропроводности. На стационарной фазе резко снижается жизнеспособность клеток водоросли и в составе ВОВ значительно возрастает доля продуктов автолиза клеток. Доля мертвых клеток по данным электропроводности выше, чем по методу окрашивания для всей кривой роста. Это свидетельствует в пользу сложного характера гетерогенности структуры популяции водоросли *Chlorella pyrenoidosa* по функциональному состоянию. В накоплении ВОВ увеличивается роль выделений функционально мертвыми клетками (по низкочастотной проводимости). Следовательно, при учете ВОВ необходимо принимать во внимание функциональное состояние клеток, что позволит точнее оценивать внеклеточную продукцию водорослей, а также регулировать биотехнологические циклы с использованием культур микроводорослей.

Изучение характеристик флуоресценции у культур, выращиваемых на фильтрах сред разного возраста свидетельствуют, что физиологически активные метаболиты, накопившиеся в составе ВОВ водоросли приводят к инактивации ФС2 водоросли *Chlorella pyrenoidosa*. Подавление выхода флуоресценции на уровне F_m при неизменном уровне F_0 , внешне сходно с изменениями этих параметров при фотоингибировании, однако происходящими медленнее. В контроле наблюдали близкое к линейному уменьшение медленной фазы нарастания F_m по мере старения культуры. В опыте подавление медленной фазы выражено ярко и к концу 14-сут. эксперимента у культур, растущих на 3, 7 и 14-сут. среде медленная фаза

нарастания F_m практически отсутствовала. Известно, что две фазы индукционной кривой нарастания флуоресценции в присутствии диурона указывают на функционирование двух различных фракций РЦ ФС 2 (сс-и р-центров), отличающихся по скорости формирования восстановленного хинонного акцептора Q_A . Можно предположить, что фильтраты сред содержат внеклеточные метаболиты, способные воздействовать на фотосинтетический аппарат клеток, смещая гетерогенность структуры РЦ ФС 2 (а-и Р-центров) в сторону уменьшения количества Р-центров, или медленно восстанавливающих Q_A центров. Снижение фотосинтетической активности клеток водоросли в присутствии фильтратов культур разного возраста может быть следствием адаптивной реакции, направленной на переживание неблагоприятных условий среды. В этом случае возможность взаимопревращений α - и β РЦ, возможно, реализуется в пользу сс-центров, у которых скорость формирования восстановленного хинона в 2-3 раза выше, чем у β -центров, что может быть биологически целесообразно для сохранения жизнеспособности культуры. Полученные результаты свидетельствуют о возможности существования механизма регуляции развития культур водорослей путем воздействия метаболитов, скорее всего, фенольной природы на функционирование фотосинтетического аппарата клеток.

Совершенно логично при этом выглядит снижение роста численности клеток водоросли, наблюдавшееся нами в экспериментах. Стимуляция фотосинтетической активности и роста численности клеток при росте культуры *Chlorella pyrenoidosa* на фильтрате 3-сут. культуры можно объяснить быстрым накоплением в ВОВ фенольных соединений из группы флавоноидов. Однако, стимуляция быстро сменялась ингибированием наблюдаемых параметров, причем более интенсивным, чем таковые для 7-сут. фильтратов культуры. Это связано, скорее всего с деструкцией исходных метаболитов и накоплением высокотоксичных для водоросли продуктов -хинонов, гидроперекисей, альдегидов, кетонов и других. Рост культур на 14-сут. фильтратах подавлялся практически полностью.

При развитии культур зеленых микроводорослей появляется возможность токсического действия НЖК из состава ВОВ. Сравнительный анализ токсичности стеариновой (18:0), олеиновой (18:1), линолевой (18:2), линоленовой (18:3) ЖК показал, что при инкубировании клеток водоросли с экзогенными ЖК, скорость инактивации была тем выше, чем более ненасыщенной была ЖК. После 12 ч инкубирования степень подавления F_v/F_m становилась одинаковой для всех НЖК, независимо от степени ненасыщенности. Существенным на наш взгляд является сходство в кинетике изменений параметров флуоресценции при действии экзогенных ЖК и фильтратов сред водоросли разного возраста. В обоих вариантах экспериментов наблюдали подавление выхода флуоресценции на уровне F_m , однако, при действии ЖК не происходило элиминирования медленной фазы

нарастания F_m . Следовательно, внеклеточные метаболиты активно участвуют в регуляции роста и развития культур зеленых микроводорослей путем воздействия на фотосинтетическую активность, а накопление метаболитов в старых культурах может приводить к подавлению физиологической активности клеток вплоть до прекращения роста культур.

Очевидно, в естественных условиях накопление ВОВ, нередко обладающих высокой биологической активностью, создает возможности как для их использования в энергетическом обмене микроорганизмов и водорослей, так и для участия ВОВ в регуляции развития самих водорослей.

Рассмотрев задачи поставленные нами выше, можно сделать следующие выводы:

1. Выделение внеклеточных органических веществ в культуре *Chlorella pyrenoidosa* S-39 в процессе развития культуры определяется физиологическим состоянием клеток. В экспоненциальную фазу динамика накопления ВОВ соответствует динамике изменений фотосинтетической активности и жизнеспособности клеток водоросли. В стационарную фазу ВОВ накапливаются с ускорением в связи с резким снижением фотосинтетической активности и увеличением проницаемости клеток, судя по данным электроспектроскопии культуры.

2. Сопоставление доли мертвых клеток по электрической проводимости на низких частотах и таковой по методу окрашивания показало, что в экспоненциальную фазу функционально мертвые клетки составляют 25-30% и 2,5-5%, а в стационарную фазу 50-60% и 20-25% соответственно. Выбор критерия оценки доли живых и мертвых клеток имеет важное значение при определении происхождения ВОВ.

3. Физиологически активные метаболиты фильтратов сред культуры *Chlorella pyrenoidosa* S-39 приводят к инактивации ФС2 клеток водоросли. При этом происходит подавление медленной фазы индукционной кривой нарастания

максимальной флуоресценции. Очевидно, метаболиты влияют на гетерогенность РЦ ФС 2 вызывая уменьшение количества β -центров (медленно восстанавливающих первичный хинон) в пользу более эффективных α -центров, что биологически целесообразно для сохранения жизнеспособности культуры. Наблюдаемое снижение активности ФС 2 сопровождается снижением роста численности, что может быть следствием адаптивной реакции, направленной на переживание неблагоприятных условий среды.

4. При инкубировании клеток водоросли с экзогенными ЖК, происходит инактивация ФС2 внешне (по характеру изменений характеристик флуоресценции) сходно с таковой при фотоингибировании. Скорость инактивации ФС 2 тем выше, чем более ненасыщенной является ЖК, но после 12 ч инкубирования степень инактивации ФС 2 не зависит от степени ненасыщенности ЖК.

Полученные в работе данные позволяют полагать, что в естественных условиях накопление ВОВ, нередко обладающих высокой биологической активностью, создает возможности как для их использования в энергетическом обмене микроорганизмов и водорослей, так и для участия ВОВ в регуляции развития самих водорослей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бульон В.В. Внеклеточная продукция фитопланктона // Усп. совр. биологии. 1977. Т. 84. N 5. С. 294-298.
2. Бульон В.В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л.: Наука. 1983. 150 с.
3. Верещагин А.Г., Клячко-Гурвич Г.А. Строение и количественный состав жирных кислот липидов водоросли *Chlorella*// Биохимия. 1965. Т. 30. В. 3. С. 543-550.
4. Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С. Стресс у растений (Биофизический подход). М: Изд-во Моск.ун-та. 1993. 144 с.
5. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. М.: Наука. 1990. 200 с.
6. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука. 1972. 252 с.
7. Горбунова М.П. Альгология. М.: Высш.школа. 1991. 256 с.
8. Горская Н.В. Выделение в среду органических веществ синхронной культурой *Chlorella pyrenoidosa* штамм S-39. // Автореф. канд. дис. М. 1978. 24 с.
9. Горюнова СВ. Прижизненные выделения водорослей, их физиологическая роль и влияние на общий режим водоемов // Гидробиол. журн. 1966. Т. 2. № 4. С. 80-88.
10. Грановская Л.А., Телитченко Л.А. Некоторые особенности переокисления растворенного органического вещества, экскретируемого *Chlorella pyrenoidosa* Chick. S-39 на свету и в темноте // Гидробиол. ж. 1978. Т. 14. № 4. С. 71-76
11. Калачева Г.С, Сущик Н.Н. Состав жирных кислот в зависимости от возраста и минерального питания культуры // Физиол. раст. 1994. Т. 41. № 2. С. 275-282.
12. Кафаров Р.С., Шендерова Л.В., Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Ингибирование фотосинтеза, накопление перекисей липидов и гибель клеток хлореллы при интенсивном освещении// Физиол. растений. 1989. Т. 35. № 3. С. 458-463.
13. Келл Д.Б. Принципы и возможности спектроскопии электрического адмиттанса // Биосенсоры. Ред. Э.Тернер, И.Карубе, Дж. Уилсон. М.: Мир. 1992. С. 344-374.
14. Кирилова В.С. Изучение липидного комплекса некоторых

- представителей азотфиксирующих синезеленых водорослей и хлореллы // Автореф. дис. канд.биол.наук. Киев. 2000.25с.
15. Максимова И.В., Торопова Е.Г., Пименова М.Н. Накопление органического вещества в растущих культурах водорослей // Микробиология. 1965. 34. № 3. С.483-490.
 16. Максимова И.В., Корженко В.П. Выделение азотсодержащих веществ *Chlorella pyrenoidosa* шт. S-39.// Биол. науки. 1972. № 8. С. 106-111.
 17. Максимова И.В., Пименова М.Н. Выделение органических кислот зелеными одноклеточными водорослями // Микробиология. 1969. 38. № 8. С.77-86.
 18. Максимова И.В., Пименова М.Н. Внеклеточные продукты зеленых водорослей. В кн.: Физиологически активные соединения биогенного происхождения. М.: МГУ. 1971. С.30-31.
 19. Максимова И.В., Горская Н.В. Внеклеточные органические продукты микроводорослей // Научн. докл. высшей школы. Биол.науки. 1980. № 6. С. 5-21.
 20. Максимова И.В., Горская Н.В., Пименова М.Н. Выделение органических веществ *Chlorella pyrenoidosa* в процессе роста и деления клеток // Микробиология. 1972. Т. 41. № 1.С. 59-63.
 21. Максимова И.В., Даль Е.С. Выделение гликолевой кислоты клетками *Chlorella pyrenoidosa* // Микробиология. 1975. Т. 44. В. 6. С. 1057-1063.
 22. Максимова И.В., Сидорова О.А. Светозависимый антибактериальный эффект водорослей и его экологическое значение // Гидробиол. ж. 1986. Т. 22. № 6. С. 3-11.
 23. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона // Итоги науки и техн. Биофизика. 1990. Т. 40. ВИНТИ. С. 49-100.
 24. Остроумов С.А. Введение в биохимическую экологию. М.: МГУ. 1986.176 с.
 25. Пименова М.Н., Максимова И.В. Накопление органического вещества в автотрофных культурах водорослей// Биология автотрофных микроорганизмов. М.: МГУ. 1966. С. 126-138.
 26. Плеханов С.Е., Максимова И.В. Функциональное состояние культур хлорококковых водорослей и накопление внеклеточных органических веществ // Физиол. раст. 1996. Т. 43. №1. С. 116-123.
 27. Плеханов С.Е., Максимова И.В. Внеклеточное органическое вещество водоросли *CHLORELLA* : количественные аспекты // Вестник Моек ун-та. Сер. 16. Биол. 1997. №2. С. 25-28.
 28. Плеханов СЕ. Первичные функциональные реакции пресноводных зеленых водорослей на химическое загрязнение. // Автореф. Дис. докт. Биол. наук. 1999. М.: МГУ. 50с.
 29. Рубин А.Б. Лекции по биофизике. М.: МГУ. 1994. 160 с.
 30. Сакевич А.И. Экзометаболиты пресноводных водорослей. Киев: Наук,

- думка. 1985. 200 с.
31. Саут Р., Уиттник А. Основы альгологии. М.: Мир. 1990. 595 с.
 32. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. Киев: Наукова думка. 1988. 256 с.
 33. Тамбиев А.Х., Шелястина Н.Н., Болдырева Л.С. Изучение биологической активности экзометаболитов одноклеточных морских водорослей // Физиол. раст. 1981. Т. 28. №3. С. 31-35.
 34. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н. Выделение органического вещества у морских водорослей // Успехи совр. биол. 1981. Т.92. Вып. 1(4). С. 100-114.
 35. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Шелястина Н.Н. Выделение органических соединений морскими водорослями // Вестн. Моек ун-та. Сер. 16. Биол. 1983. №1. С. 52-55.
 36. Таутс М.И. Внеклеточные жирные кислоты хлореллы // Мат. VIII Всес. раб. совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев.: Наукова думка. 1974. С. 83-85.
 37. Таутс М.И. Фенольные соединения культуральной среды бактериально чистой культуры *Chlorella* // Физиол. раст. 1978. Т. 25. № 2. С. 401-404.
 38. Таутс М.И. Фенольные соединения бактериальной культуры хлореллы и некоторая их характеристика // Физиол. раст. 1983. Т. 30. № 2. С. 332-340.
 39. Таутс М.И., Семененко В.Е. Выделение и идентификация физиологически активных веществ индольной природы во внеклеточных метаболитах хлореллы // Докл. АН СССР. 1971. Т.198. №4. С.970-973.
 40. Телитченко М.М., Шестерин И.С., Иванов Э.В. Изучение антиокислительной и биологической активности внеклеточных метаболитов зеленых водорослей в процессе их роста // Биол. науки. 1972. № 8. С. 26-27.
 41. Телитченко М.М., Шестерин И.С., Иванов Э.В., Гельфанд Е.С. Изучение антиокислительной и биологической активности внеклеточных метаболитов зеленых протококковых водорослей в процессе их роста // Биол. науки. 1972. № 8. С. 55-59.
 42. Царенко В.М. Особенности внеклеточного накопления органических кислот у некоторых видов водорослей // Гидробиологический журнал 1984. Т. 19. № 1. С. 88-92.
 43. Чемерис Ю.К., Корольков Н.С., Сейфуллина Н.Х., Рубин А.Б. Комплексы ФС II с дестабилизированным первичным хинонным акцептором электронов у адаптированной к темноте *Chlorella* // Физиол. раст. 2004. Т.51. №. 1. С. 1-7.
 44. Яглова Л.Г. Электропроводимость биологических систем В кн.: Биофизика, (ред. Б.Н.Тарусов, О.Р.Кольс). М.: Высш. шк. 1968. С. 186-

215.

45. Allen M.B. Excretion of organic compounds by *Chlamidomonas* // Arch. Microbiol. 1956. V. 24. P. 163-168.
46. Berman Thomas. Release of dissolved organic matter by photosynthesising algae in Lake Kinneret, Israel // Freshwater Biol. 1976. N 1. P. 13-18.
47. Bjornsen P. K. Phytoplankton exudation of organic matter: Why do healthy cells do it? // Limnol. and Oceanogr. 1988. V. 33. N 1. P. 151-154.
48. Billmire E., Aaronson S. The secretion of lipids by the freshwater phytoflagellate *Ochromonas danica*//Limnol. and Oceanogr. 1976. V.21. N 1. P. 138-140.
49. Bordi F., Cametti C, di Biasie A. Passive electrical properties of biological cell membranes determined from Maxwell-Wagner conductivity dispersion measurements // Bioelectrochem. Bioenerg. 1989. V. 22. N 2. P. 135-144.
50. Cole K.S. Membranes, Ions and Impulses. Berkely and Los Angeles : Univ. of California Press, 1968.258 p.
51. Fogg G.E., Nalewaiko C, Watt W. Extracellular products of phytoplankton photosynthesis // Proc. Roy. Soc. London. Ser. b. 1965. V. 162. P. 517-534.
52. Fricke H. Relation of the permittivity of biological cell suspensions to fractional cell volume //Nature. 1953. V.172. N 438. P.731-732.
53. Falkowski P.G., Kiefer A. Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass//J. Plankton Res. 1985. V. 7. N 5. P. 715-731.
54. Govindjee O.D., Ames J., Fock D. Light emission by plants and bacter // Orlando. Acad. Press. 1986.650 p.
55. Gladyshev M.I., Kalachova G.S., Sushchik N.N. Free fatty acids of surface film of water in the Sydinsky bay of the Krasnoyarsk reservoir // Internacionale Revue der gesament Hydrobiologia. 1993. V. 78. P. 575-587.
56. Golbeck J.H., Martin I.F., Fowler C.E. Mechanism of linolenic acid-induced inhibition of photosynthetic electron transport// Plant Physiol. 1980. V.65. P. 707-713.
57. Hama T. Production and turnover rates of fatty acids in marine particulate matter trough phytoplankton photosynthesis//Mar. Chem. 1991. V. 33. P. 213-227.
58. Hama T., Matsunaga K., Handa N. and Takahashi M. Fatty acids composition in photosynthetic products of natural phytoplanktonpopulation in Lake Biwa, Japan //J. of Plankton Res. 1992. V. 14. N 8. P. 1055-1065.
59. Kaplan A., Berry J.A. Glicolate Excretion and the Oxygen to Carbon Dioxide Net Exchange Ratio during Photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 1981. V. 67. P. 229-232.
60. Kramer W.A., Furbacher P.N., Szszeponiak A., Tae G.S. Electron transport between Photosystem II and Photisysten I // Curr. Topics bioenerg. 1991. V. 16. P. 179-222.
61. Lewin R.A. Extracellular polysaccarides of green algae // Can. J. Microbiol.

- V. 2. 1956. P.-665-672.
62. Lewin R.A. Antibiotics from algae // Physiology and Biochemistry of Algae. N.Y.-L. 1962. P. 811-812.
 63. Maque T.H., Friberg E., Hughes D.J., Morris J. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: a physiological approach // Limnol. and Oceanogr. 1980. V. 25. N2. P.262.
 64. Marx G.H., Davey C.L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology//Enz. Microb. Technol. 1999. V. 25. N 3-5. P.161-171.
 65. Melis A., Anderson J.M. Structural and functional organization of the photosystems in spinach chloroplasts. Antenna size, relative electron transport capacity and chlorophyll composition // Biochi.Biophys. Acta. 1983. V. 724. P. 473-484.
 66. Riemann B., Sondergaard M. Bacterial growth in relation to phytoplankton primary production and extracellular release of organic carbon // Heterotroph. Activ. Sea Proc. NATO Adv. Res. Instit. Microb. Metab. and Cycl. Org. Matter Sea, Cascais, Nov. 1981. N.Y., L. 1984. P.233-248.
 67. Sieburth J. McN. Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1969. V. 3. P. 290-309.
 68. Watt W.D., Fogg Y.E. The kinetics of extracellular glicollate production by *Chlorella pyrenoidosa*//J. Exp.Bot. 1966. 17.117-134.
 69. Wiebe W.J., Smith D.F. C14-Labeling of the compounds excreted by phytoplankton for employment as a realistic tracer in secondary productivity measurements // Microb.Ecol. 1977. N 1.P. 1-8.
 70. Wilhelm C. The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll b and chlorophyll c containing algae // Plant. Physiol. Biochem. 1990. V. 28 (2). P. 293-306.
 71. Андреева В.М., «Род *Chlorella*. Морфология, систематика, принципы классификации» // Л.1990 г.
 72. «Алтайская правда» // № 335 (23897) от 27 декабря 2001г.
Большой энциклопедический словарь // под ред..Гилярова М.С.
 73. «Практикум по систематике растений и грибов» // А.Г.Еленевский, М.П.Соловьева, Н.М.Ключникова и др. М.: Издательский центр «Академия», 2001г.
 74. «Биология в трех томах» Тейлор Д, Грин Н, Стаут У. // Изд. «Мир», 2002г.