

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *Anabaena variabilis*

Проведено исследование уровня и характера изменений Eh в культурах цианобактерий. В процессе роста *Anabaena variabilis*, при нарастании количества хлорофилла *a* и каротиноидов значение окислительно-восстановительного потенциала культуральной жидкости остается на постоянном уровне. Постоянство этого фактора обусловлено, очевидно, свойством цианобактерий регулировать уровень Eh путем выделения в среду соответствующих веществ. Установлено, что в процессе роста цианобактерий возрастает восстановительная емкость среды.

Введение

Из числа многих проблем, решаемых экологами, особое значение приобретает проблема массового развития цианобактерий или «цветение». Вредоносность «цветения» заключается в продуцировании цианобактериями различных сильнодействующих токсинов, опасных для человека и животных, в снижении качества воды, нарушении эстетического вида водоемов и т.д., что в конечном итоге может привести к деградации водных экосистем [1, 2]. Проблему осложняет и широкое распространение цианобактерий. Они встречаются на всех континентах, в различных экосистемах — на суше, в пресных и соленых водах [3].

«Цветение» воды вызывают, как правило, представители нескольких родов цианобактерий, в т.ч. рр. *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Gomphosphaeria* [4, 5]. Несмотря на то, что строение, физиология и экология цианобактерий на планктонной стадии их жизненного цикла изучена достаточно хорошо, вопрос об эффективных экологически безопасных способах защиты водоемов от «цветения» еще не решен [6-8].

Ю.М. Поляк*,
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник,
ФГБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук

Т.Д. Шигаева,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник,
ФГБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук

В этой проблеме большой научный и практический интерес представляет такой фактор среды обитания микроорганизмов, как окислительно-восстановительный потенциал (Eh).

К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о значительном влиянии этого фактора на процессы роста и физиолого-биохимическую активность у всех групп микроорганизмов [9-12], в т.ч. у цианобактерий [13, 14]. С помощью Eh можно достоверно определить не только уровень аэрации, но и степень окисленности и восстановленности среды в целом [15], судить о стадии роста культуры, активности отдельных ферментов и метаболизма [16, 17], а также, в значительной степени, целенаправленно регулировать эти процессы [12, 14, 18, 19].

Однако следует отметить, что у исследователей часто возникают затруднения не только при измерении Eh в развивающейся культуре, но и при интерпретации получаемых результатов. В значительной степени это объясняется чрезвычайной сложностью биологических систем. Величина Eh микробных культур зависит одновременно от множества факторов: химического состава питательной среды, pH, pO₂, изменения состава среды в результате потребления или трансформации некоторых ее компонентов и выделения различных микробных метаболитов и др.

В связи с этим, в каждом конкретном случае требуются методические исследования, связанные с выбором материала редоксметрического электрода, окислительно-восстановительных медиаторов, ускоряющих перенос электронов между электродом и клетками микроорганизмов, использование косвенных методов контроля Eh, если невозможны прямые измерения. В настоящей работе исследовали уровень и характер изменения Eh в культурах цианобактерий в процессе их культивирования.

*Адрес для корреспонденции: yuliapolyak@mail.ru

Материалы и методы исследования

В работе использовали альгологически чистую культуру цианобактерий *Anabaena variabilis* K ü t z (CALU 458) из коллекции Биологического института СПбГУ (Санкт-Петербург). Цианобактерии выращивали и поддерживали на питательной среде BG₁₁ [20], следующего состава (г/л): NaNO₃ – 1,5, KH₂PO₄×3H₂O – 0,04, MgSO₄×7H₂O – 0,075, CaCl₂×2H₂O – 0,036, кислота лимонная – 0,006, цитрат железа – 0,006, Na₂CO₃ – 0,02, ЭДТА – 0,001. В питательную среду вносили раствор металлов в количестве 1 мл на 1 л среды. Состав раствора металлов (г/л): H₃BO₃ – 2,86, MnCl₂×H₂O – 1,81, ZnSO₄×7H₂O – 0,222, Na₂MoO₄×2H₂O – 0,39, CuSO₄×5H₂O – 0,08, CoSO₄×7H₂O – 0,049.

Культивирование цианобактерий проводили в течение 24 сут в статических условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл питательной среды. В качестве посевного материала использовали культуру цианобактерий конца логарифмической фазы роста в количестве 5 % по объему. Интенсивность освещения составляла 25 μmol/m²/s, температура культивирования – 25 °С.

Прирост биомассы цианобактерий учитывали весовым методом. Контроль пигментного комплекса осуществляли по изменению содержания хлорофилла *a* и каротиноидов, определяемых по оптической плотности характерных полос поглощения на спектро-

В.А. Кудряцева, кандидат химических наук, заведующая лабораторией, ФГБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук

В.И. Сухаревич, доктор технических наук, главный научный сотрудник, ФГБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук

фотометре Genesys 10uv scanning («Thermo Spectronic», США).

Экстракцию хлорофилла *a* и каротиноидов проводили 90 % ацетоном при 4 °С в течение 24 ч. Концентрацию хлорофилла *a* рассчитывали по формуле Джеффри и Хамфри [21]: хлорофилл *a* (мг/л) = 11,85 A₆₆₄ – 1,54 A₆₄₇ – 0,08 A₆₃₀.

Содержание каротиноидов рассчитывали по уравнению, предложенному Парсонсом и Стриклендом [22]: каротиноиды (мг/л) = 4,75 A₄₅₃ – 0,226(6,4 A₆₆₃ + 18,8 A₆₆₄).

Измерения pH и Eh осуществляли с помощью pH-метра N5170. Для измерения Eh использовали электроды трех типов: точечный платиновый ЭПВ-01, платиновый игольчатый диаметром 0,5 мм, редоксметрический стеклянный электрод ЭО-01; pH определяли электродом ЭСЛ 43-07. В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1М4 в насыщенном растворе KCl, а в качестве электролитического ключа – 3 % агар-агар в насыщенном растворе KCl.

Перед использованием платиновые электроды очищали в среде сильнодействующего окислителя – хромовой смеси, а стеклянные – в смеси концентрированных HF и H₂SO₄ кислот в соотношении 1:2. Далее электроды тщательно отмывали дистиллированной водой и проверяли по контрольным растворам [23]. Стерилизацию электродов проводили в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования проведен выбор типа электродов для измерения Eh культуральной среды цианобактерий. Как показали результаты исследований, расхождения в показаниях точечных платиновых электродов ЭПВ-01 были велики и достигали 100 мВ, что, по-видимому, обусловлено малой поверхностью электродов и недостаточной буферностью контролируемой редокс-системы. При использовании стеклянных редоксметрических электродов не удалось получить стабильных значений электродных потенциалов из-за низкой скорости процессов, протекающих на границе электрод-раствор. Игольчатые платиновые электроды показали достаточно хорошую сходимость величин электродных потенциалов. Так, в первые сутки развития культуры расхождения в уровнях Eh составляли

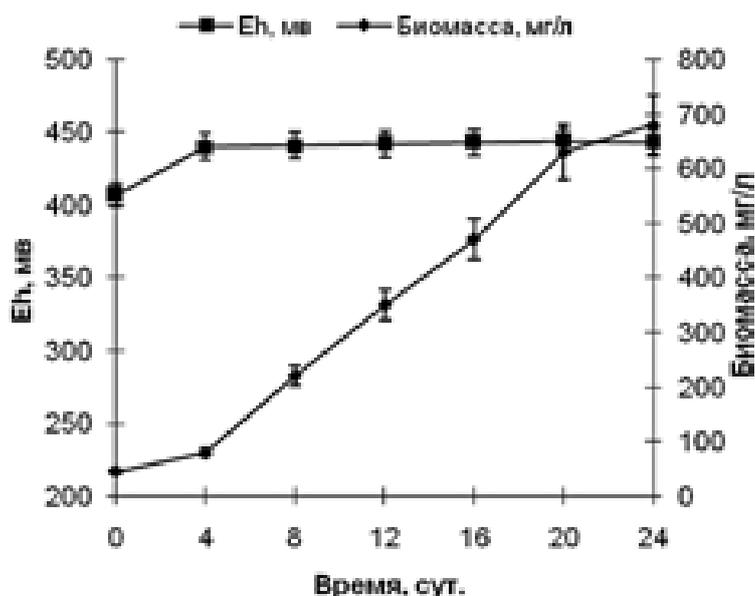


Рис. 1. Динамика изменения Eh среды в процессе роста *Anabaena variabilis*.

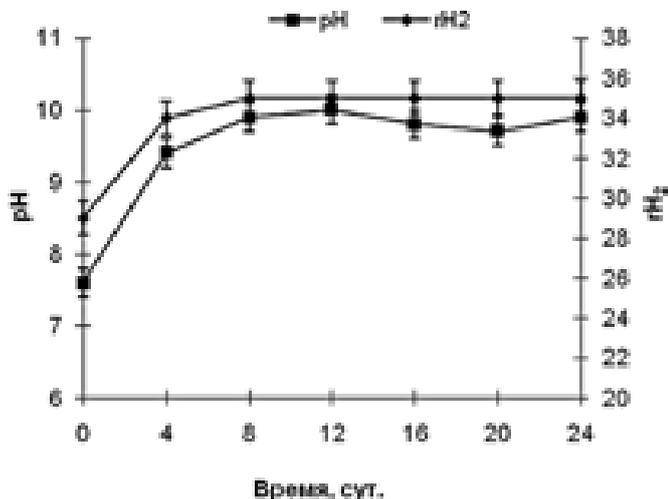


Рис. 2. Динамика изменения pH и rH₂ среды в процессе роста *Anabaena variabilis*.

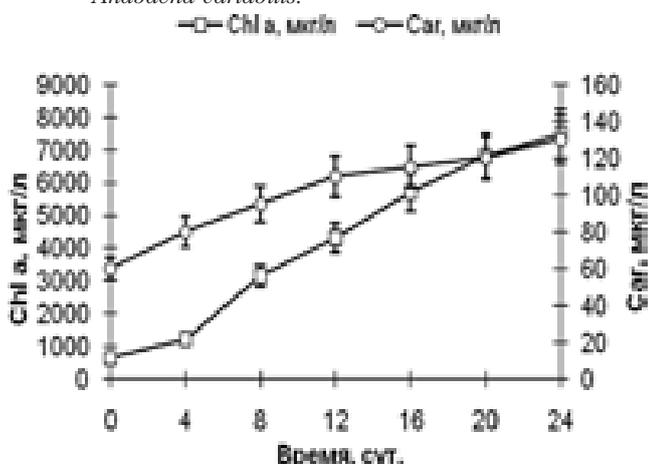


Рис. 3. Динамика накопления хлорофилла *a* и каротиноидов в процессе культивирования *Anabaena variabilis*.

10-12 мВ, на стадии активного роста — 5-6 мВ. На основании этих результатов для последующих исследований окислительно-восстановительного потенциала в культуре цианобактерий был выбран именно этот тип электродов.

Электроды в количестве 2 штук, закрепленные в ватно-марлевой пробке, помещали в колбу с питательной средой и посевным материалом. Измерение Eh в процессе культивирования *Anabaena variabilis* показало, что в течение первых четырех суток Eh возрастает на 40 мВ и достигает уровня 450 мВ, который остается неизменным до конца культивирования, т.е. в последующие 20 сут (рис. 1).

При оценке величины Eh важно учитывать и уровень другого физико-химического фактора среды — pH, который, как известно, оказывает влияние на Eh [10, 24]. Как сле-

Таблица 1

Восстановительная емкость культуральной жидкости в процессе роста *Anabaena variabilis*

Т, сут	0	3	8	10	15
β, моль/л	1,0·10 ⁻⁷	9,6·10 ⁻⁶	2,0·10 ⁻⁵	3,3·10 ⁻⁵	4,1·10 ⁻⁵

дует из рис. 2, pH с первых суток культивирования цианобактерий устанавливается на постоянном уровне, что, в определенной степени, обуславливает и постоянство уровня окислительно-восстановительного потенциала, выраженного в единицах rH₂.

На рис. 3 представлены результаты измерения фотосинтетических пигментов — хлорофилла *a* и каротиноидов, образованных *Anabaena variabilis* в процессе ее развития. В соответствии с ростом *Anabaena variabilis*, содержание в культуральной жидкости хлорофилла *a* и каротиноидов возрастает. При этом продуктивность биомассы по хлорофиллу *a* возрастает в первые 8 сут, а в последующие 16 сут незначительно снижается (рис. 4). Аналогичные результаты получены и в случае с каротиноидами, с той лишь разницей, что продуктивность по этому пигменту снижается более значительно.

Постоянство уровня Eh в процессе роста цианобактерий при увеличении количества образуемых хлорофилла *a* и каротиноидов обусловлено, по-видимому, тем, что при этом устанавливается равновесие между количеством растворенного кислорода и количеством восстановленных веществ, выделяемых культурой в среду. В связи с этим были проведены эксперименты по определению восстановительной емкости (β) редуцирующих веществ, образующихся цианобактериями в процессе роста.

Восстановительная емкость характеризует степень восстановленности среды. Для определения величины восстановительной емкости используют ферри-ферроцианидную систему [25]. Рост окислительно-восстановительного потенциала системы K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ при контакте с исследуемым объектом свидетельствует об окисленном, уменьшение — о восстановленном состоянии среды. Восстановительную емкость рассчитывают по уравнению (1):

$$\beta = \frac{C_{ox} \cdot C_{red} \cdot \text{antg} \frac{E_1 - E_2}{\theta - 1}}{C_{ox} + C_{red} \cdot \text{antg} \frac{E_1 - E_2}{\theta}}, \text{ где (1)}$$

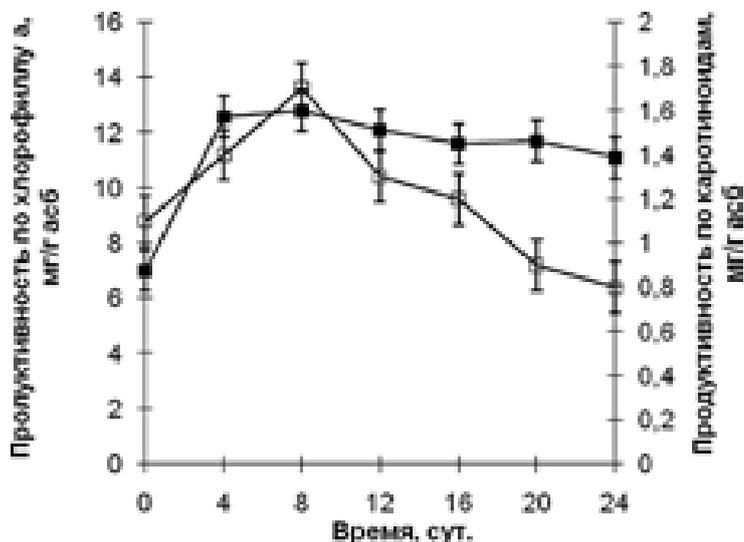


Рис. 4. Продуктивность биомассы *Anabaena variabilis* по хлорофиллу a (■) и каротиноидам (□) в процессе культивирования.

C_{ox} и C_{red} — концентрации окисленной и восстановленной форм системы $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$;

E_1 и E_2 — окислительно-восстановительные потенциалы системы $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ до и после внесения в реакционную среду цианобактерий;

$$q = 2,3 RT/F$$

Для определения b первоначально определялся потенциал (E_1) системы $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, приготовленной на питательной среде и при соотношении $C_{ox}/C_{red} = 10^{-4}/10^{-5}$ моль/л. Затем в измерительную ячейку наливали 50 мл культуральной жидкости *Anabaena variabilis* на разных стадиях роста и добавляли 0,5 мл раствора $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ($10^{-2}/10^{-3}$ моль/л).

Как следует из данных, представленных в табл. 1, по мере роста цианобактерий восстановительная емкость культуральной жидкости возрастает.

Полученные результаты согласуются с результатами других авторов, полученными с использованием таких бактерий, как *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas fluorescense*, а также дрожжеподобных грибов *Candida utilis* [26].

Заключение

Таким образом, в процессе роста цианобактерий *Anabaena variabilis*, при нарастании количества хлорофилла a и каротиноидов, интенсивном фотосинтезе, значение

окислительно-восстановительного потенциала культуральной жидкости остается на постоянном уровне. Как и в случае с другими микроорганизмами, постоянство этого фактора, очевидно, обусловлено свойством цианобактерий регулировать уровень Eh путем выделения в среду соответствующих веществ. Как показано в настоящей работе, по мере накопления в культуральной жидкости биомассы цианобактерий и фотосинтетических пигментов возрастает и восстановительная емкость среды. Фактор постоянства Eh при росте цианобактерий следует учитывать при анализе биомониторинговых наблюдений на водоемах.

Очевидно, что регуляция окислительно-восстановительного потенциала при дополнительном внесении в среду окислителей и восстановителей позволит целенаправленно влиять на процессы жизнедеятельности цианобактерий.

Ключевые

слова: цианобактерии, окислительно-восстановительный потенциал, восстановительная емкость, хлорофилл a , каротиноиды

Литература

1. Румянцев В.А. Супрамолекулярные регуляторы цветения водоемов / В.А. Румянцев, Л.Н. Крюков // Вестник Российской Академии Наук. 2012. Т. 82. №6. С. 552-557.
2. Pliński M. The potential causes of cyanobacterial blooms in Baltic Sea estuaries / Pliński M., Mazur-Marzec H., Józwiak T., Kobos J. // Oceanol. Hydrobiol. Studies. 2007. V. 36. №1. P. 134-137.
3. Кукк Э.Г. Отдел синезеленые водоросли (Cyanophyta) / Жизнь растений: В 6-и т. М.: Просвещение, 1977. Т. 3. С. 78-92.
4. Белякова Р.Н. Водоросли, вызывающие «цветение» в водоемах северо-запада России / Р.Н. Белякова, Л.Н. Виноградова, Р.М. Гогорев, Л.Н. Волошко, О.В. Гаврилова М.: Наука, 2006. 220 с.
5. Paerl H.W. Harmful algal blooms with an emphasis on cyanobacteria / Paerl H.W., Fulton III R.S., Moisaner P.H., Dyle J. // Scientific World Journal. 2001. V. 1. P. 76-113.
6. Колмаков В.И. Методы предотвращения массового развития цианобактерии *Microcystis aeruginosa* Kutz emend. Elenk. в водных системах // Микробиология. 2006. Т. 75. №2. С. 149-153.
7. Henga L. Algae removal by ultrasonic irradiation-coagulation / Henga L., Juna N., Wen-jieb H., Guibai L. // Desalination. 2009. V. 239. №1-3. P. 191-197.
8. Hu H. Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes / Hu H., Hong Y. // Front. Environ. Sci. Engin. China. 2008. V. 2. №4. P. 421-438.
9. Шульц М.М. Окислительный потенциал. Теория и практика / М.М. Шульц, А.М. Писаревский, И.П. Полозова. Л.: Химия, 1984. 160 с.

10. Работнова И.Л. Роль физико-химических условий (рН и гН₂) в жизнедеятельности микроорганизмов. М.: Из-во АН СССР. 1957. 276 с.
11. Сухаревич В.И. Влияние аэрации и окислительно-восстановительного потенциала среды на рост и биосинтез протеиназ фибринолитического действия грибом *Coprinus cinereus* / В.И. Сухаревич, И.П. Семенова, Н.П. Денисова // Биотехнология. 1994. №11-12. С. 16-19.
12. Сухаревич М.Э. Влияние аэрации и окислительно-восстановительного потенциала на биосинтез противогрибкового антибиотика имбрицина / М.Э. Сухаревич, Е.П. Яковлева, О.Г. Борисова, В.И. Сухаревич // Антибиотики и химиотерапия. 1998. Т. 43. №12. С. 12-15.
13. Richardson L.L. Enhanced survival of the cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* in darkness under anaerobic conditions / Richardson L.L., Castenholz R.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. №9. P. 2151-2158.
14. Shi X. Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness / Shi X., Yang L., Niu X., Xiao L., Kong Z., Qin B., Gao G. // Microbiol. Res.. 2003. V. 158. №4. P. 345-352.
15. Dahod, S.K. Redox potential as a better substitute for dissolved oxygen in fermentation process control // Biotechnol. Bioeng. 1982. V. 24. №9. P. 2123-2125.
16. Панкова Л.М. Влияние окислительно-восстановительного потенциала среды на метаболизм этанолпродуцирующих бактерий *Zyotomonas mobilis* / Л.М. Панкова, Ю.Э. Ивинка, М.Е. Бекер // Изв. АН Латв. СССР. 1985. №11 (460). С. 77-80.
17. Brünger R. The redox potential as an indicator of microbial metabolic processes in north German waters // Radiat. Environ. Biophysics. 1982. V. 21. №2. P. 141-154.
18. Konings W.N. Relation between the protonmotive force and solute transport in bacteria / Konings W.N., Otto R., Ten Brink B., Robillard G.T., Elferink M.G., Hellingwerf K.J. // Biochem. Soc. Trans. 1984. V. 12. №2. P. 152-154.
19. Petrov R.R. Effect of redox potential on the catalytic properties of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1 / Petrov R.R., Utkin I.B., Munilla R., Fernandez V.M., Popov V.O. // Arch. Biochem. Biophys. 1989. V. 268. №1. P. 306-313.
20. Stanier R.Y. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales) / Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. // Bact. Rev. 1971. V. 35. №2. P. 171-205.
21. Jeffrey S.W. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton / Jeffrey S.W., Humphräh G.E. // Biochim. Physiol. Pflanz. Bd. 1975. V. 167. №2. P. 191-194.
22. Paerl H.W. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms / Paerl H.W., Tucker J., Bland P.T. // Limnol. Oceanogr. 1983. V. 28. №5. P. 847-857.
23. Набор унифицированных редоксметрических электродов. Паспорт IЕI. 840.068 ПС. Гомель, 1978.
24. Захарьевский М.С. Оксредметрия / Под ред. Б.П. Никольского и В.В. Пальчевского. Л.: Химия. 1967. 120 с.
25. Писаревский А.М. Система MnO₂/Mn²⁺ как потенциалоопределяющая при контроле Eh пелагических глубоководных донных отложений / А.М. Писаревский, П.Я. Тищенко, Л.М. Грамм-Осипов, Ю.И. Николаев // Доклады Академии наук. 1989. Т. 306. №1. С. 195-198.
26. Андреева Е.А. Влияние окислительно-восстановительного потенциала на рост аэробных микроорганизмов / Е.А. Андреева, И.Л. Работнова // Микробиология. 1978. Т. 47. Вып. 4. С. 637-643.

Yu.M. Polyak, T.D. Shigaeva, V.A. Kudryavtseva, V.I. Sukharevich

CHANGES OF OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL DURING CULTIVATION OF ANABAENA VARIABILIS CYANOBACTERIA

Study of rate and direction of Eh changes in cyanobacteria cultures was carried out. It was shown that oxidation-reduction potential of cultural liquid is constant during *Anabaena variabilis* growth and increasing chlorophyll and carotenoid quantities. Stability of this factor is apparently explained by cyanobacteria capacity to regulate Eh by secreted suitable substances. It was found that reduction capacity increases during cyanobacteria growth.

Key words: cyanobacteria, oxidation-reduction potential, reduction capacity, chlorophyll a, carotenoids