

**ВЛИЯНИЕ ПИРОФОСФАТА И МЕТАФОСФАТА НА УРОВЕНЬ БИОМАССЫ
ЦИАНОБАКТЕРИИ *MICROCYSTIS ICHTHYOBLABE*
В ДИНАМИКЕ РОСТА КУЛЬТУРЫ**

И.А. Ильючик, Д.М. Никитин, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет, irina.iliuchik@mail.ru

Аннотация. Исключение из среды культивирования ортофосфата угнетало рост культуры *Microcystis ichthyoblabe*. Замена ортофосфата пирофосфатом в эквивалентной концентрации стимулировала рост культуры. Это вполне может быть обусловлено особой ролью пирофосфатов в фосфорно-энергетическом метаболизме цианобактерий. Использование вместо ортофосфата метафосфата вызывало подавление роста культуры.

Ключевые слова: цианобактерии, пирофосфат, метафосфат, биомасса.

Цианобактерии играют весьма значительную роль в водных экосистемах, и в целом, в формировании атмосферы. Чрезвычайно много их в «цветущих» прудах, озерах и особенно в водохранилищах, возникших в результате перегораживания рек. Биомасса цианобактерий в зонах со стоячей водой часто достигает сотен тысяч тонн по сырой массе [1, с. 233]. В настоящее время среди множества цианобактерий известны и около 40 видов токсинопродуцирующих цианобактерий, включая представителей родов *Microcystis sp.*. Они способны накапливать активные яды не только в воде, но и в молоке, мясе домашних животных и птиц, моллюсках и рыбе, используемых в питании людей [2, с. 224].

Microcystis ichthyoblabe (микроцистис рыбозаморный) – колониеобразующая пресноводная свободноживущая цианобактерия отряда *Chroococcales sp.*, являющаяся одной из типичных представительниц рода *Microcystis*.

Часто причиной «цветения» воды являются фосфаты из-за ее загрязнения фосфорными и азотными удобрениями, смываемыми с полей, а также из-за вырубki лесистой растительности, окружающей водоемы [3, с. 29]. Фосфорные удобрения образуют обширный класс минеральных стимуляторов, отличительной особенностью которых является способность поддерживать необходи-

мый уровень влажности травянистых частей растений и почвы. Пирофосфатные и метафосфатные же удобрения являются перспективными формами обогащения почвы фосфором.

Цель работы: выявить влияние пирофосфата и метафосфата натрия на уровень биомассы цианобактерии *Microcystis ichthyoblabe* в динамике роста культуры.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлась культура *M. ichthyoblabe* из коллекции УО «Полесский государственный университет», выделенная ранее из воды пруда Марковщина Солигорского района [4, с. 95].

Цианобактерию выращивали на среде Громова № 6 (контроль 1), включающей (мг/л): KNO_3 – 1000; K_2HPO_4 – 200; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 200; CaCl_2 – 150; NaHCO_3 – 200; H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; MoO_3 – 0,015; NH_4VO_3 – 0,023; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ – 0,096; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,048; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,018; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ – 0,04; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,044; а также 1 мл раствора Fe + ЭДТА, pH среды составляла 8,2.

В качестве дополнительного контроля (контроль 2) служила среда Громова № 6, из которой исключали ортофосфат калия. Экспериментальные варианты питательной среды готовили, добавляя в эту бесфосфатную среду до конечных концентраций (моль/л) $5,74 \cdot 10^{-4}$ (данная концентрация эквивалентна концентрации K_2HPO_4 в среде Громова № 6) и $5,74 \cdot 10^{-5}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ или $2,3 \cdot 10^{-3}$ и $2,3 \cdot 10^{-4}$ NaPO_3 в каждый.

M. ichthyoblabe культивировали в стеклянных емкостях 0,10 л при температуре 30 ± 1 °С, без аэрирования, при искусственном освещении с интенсивностью 5000 лк, со световым режимом 12 ч дня/12 ч ночи и перемешивании два раза в сутки. Варианты питательной среды инокулировали пулом предварительно отмытых дистиллированной водой клеток в концентрации $1,09 \pm 0,07$ млн/мл.

Через 1, 3, 5, 7, 9, 11-е сутки определяли концентрацию клеток в культуре с помощью камеры Горяева.

Исследование производили в трех повторностях. Полученные результаты обработаны статистически, достоверность различий между вариантами определяли по *t*-критерию Стьюдента для уровня значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. На среде Громова (контроль 1) рост биомассы наблюдался в течение 7 суток. В этот период по сравнению с началом культивирования концентрация биомассы возрастала в 2,9 раза. В последующем к концу культивирования величина данного показателя снижалась по сравнению с 7-ми сутками в 1,9 раза (таблица, рисунок).

Таблица – Изменения уровня биомассы (млн клеток/мл) *Microcystis ichthyoblabe* в присутствии различных фосфатов в среде культивирования, $n = 3$

Время роста, сутки	Концентрации фосфорсодержащих солей, моль/л					
	K_2HPO_4 $1,1 \cdot 10^{-3}$ (контроль 1)	Среда без фосфатов (контроль 2)	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ $5,7 \cdot 10^{-4}$	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ $5,7 \cdot 10^{-5}$	NaPO_3 $2,3 \cdot 10^{-3}$	NaPO_3 $2,3 \cdot 10^{-4}$
1	$1,68 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$
3	$1,60 \pm 0,37\#$	$1,41 \pm 0,11$	$2,01 \pm 0,29*\#$	$2,43 \pm 0,39*\#$	$2,29 \pm 0,32*\#$	$1,20 \pm 0,13*\#$
5	$3,71 \pm 0,74\#$	$1,96 \pm 0,44*$	$3,78 \pm 0,64\#$	$2,65 \pm 0,18*\#$	$2,59 \pm 0,04*\#$	$1,15 \pm 0,17*\#$
7	$4,84 \pm 0,53\#$	$1,20 \pm 0,10*$	$4,15 \pm 0,23\#$	$3,28 \pm 0,87*\#$	$2,83 \pm 0,18*\#$	$1,98 \pm 0,26*\#$
9	$3,38 \pm 0,39\#$	$1,49 \pm 0,16*$	$5,41 \pm 0,79*\#$	$1,82 \pm 0,29*\#$	$3,71 \pm 0,49\#$	$1,90 \pm 0,26*\#$
11	$2,50 \pm 0,32\#$	$1,01 \pm 0,09*$	$3,63 \pm 0,95*\#$	$2,23 \pm 0,54\#$	$1,20 \pm 0,26*\#$	$1,91 \pm 0,67*$

Примечание: *или # – изменения статистически достоверны по сравнению с контролем 1 или 2 соответственно при $p \leq 0,05$

Исключение из среды ортофосфата резко угнетало рост культуры. При этом максимум роста отмечен через 5 суток, прирост составил 16,7% в сравнении с началом культивирования. К концу

эксперимента, даже в сравнении с 1-ми сутками, уровень биомассы составил лишь 60% начальной величины (таблица, рисунок). При этом наблюдали волнообразный характер динамики роста культуры. В сравнении с оригинальной средой Громова №6 (контроль 1), рост культуры на бесфосфатной среде угнетался на протяжении всего периода наблюдений на 12,0–59,6%.

Замена ортофосфата пирофосфатом в максимальной концентрации вызвала интенсификацию роста культуры цианобактерии: нарастание биомассы наблюдалось до 9 суток и составило 322% в сравнении с началом культивирования. Причем, к концу роста культуры на этом варианте питательной среды отмечено увеличение концентрации биомассы в сравнении с контролем 1 в 1,6 раза.

Уменьшение концентрации пирофосфата на порядок сопровождалось увеличением прироста клеток микроцистиса только к 7 суткам в 1,95 раз. И лишь через 3 суток этот вариант обеспечивал в сравнении с контролем 1 увеличение в 1,5 раза, тогда как при дальнейшем культивировании рост заметно уступал оригинальной среде Громова №6 – на 29–47%.

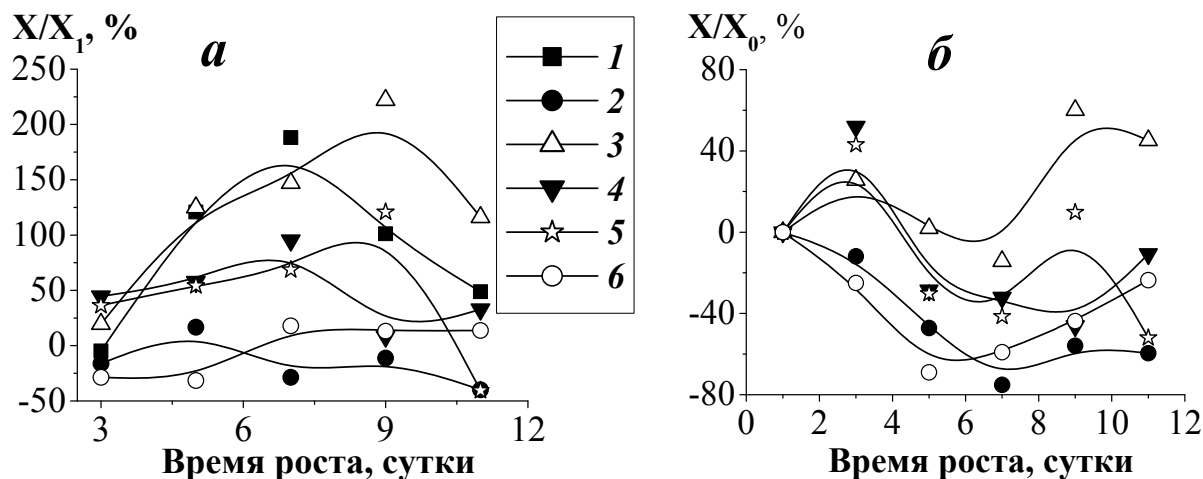


Рисунок – Изменения (%) уровня биомассы *Microcystis ichthyoblabe* при добавлении в среду культивирования фосфатов в концентрации, моль/л:

1 – K_2HPO_4 , $1,1 \cdot 10^{-3}$ (контроль 1); 2 – без фосфатов; 3 – $Na_4P_2O_7$, $5,7 \cdot 10^{-4}$; 4 – $Na_4P_2O_7$, $5,7 \cdot 10^{-5}$
5 – $NaPO_3$, $2,3 \cdot 10^{-3}$; 6 – $NaPO_3$, $2,3 \cdot 10^{-4}$ по отношению к 1-м суткам (а) или к среде Громова № 6 (б)

Замена ортофосфата метафосфатом отрицательно отразилась на росте культуры цианобактерии. Добавление этой соли в максимальной концентрации вело к нарастанию количества клеток с максимумом через 9 суток – в 1,7 раз, однако через 11 суток оно уступало контрольному варианту 1 практически в 2 раза.

Уменьшение концентрации метафосфата на порядок вело к заметному угнетению роста культуры в период 1–5 суток, причем, даже в сравнении с контролем 2 (бесфосфатная среда) на 15–42%. В последующий период, вплоть до окончания эксперимента, накопление биомассы на среде с метафосфатом в сравнении с бесфосфатной средой было выше на 23–89%. Относительно же оригинальной среды Громова №6, культивирование цианобактерии на этом варианте экспериментальной среды с меньшей концентрацией метафосфата в течение всего периода наблюдений сопровождалось значительным уменьшением уровня биомассы.

Заключение. Весьма вероятно, что усваиваемый цианобактериями фосфор в форме фосфатов, является триггером, запускающим деление клеток. Это отражено в исследованиях, демонстрирующих первостепенное влияние фосфатов на скорость роста культуры, а также фактом проблемы «цветения» водоемов в случаях преимущественно фосфатного загрязнения [6, с. 343].

Замена ортофосфата пирофосфатом в эквивалентной концентрации стимулировала рост культуры. Это вполне может быть обусловлено особой ролью пирофосфатов в фосфорно-энергетическом метаболизме ряда организмов, включая цианобактерии. В этом плане целесообразно проведение дальнейших исследований на клетках цианобактерий.

В то же время метафосфат является менее «удобным» источником фосфора и вызывал подавление роста культуры.

Полученные результаты хорошо согласуются с возможностью образования вызванных цианобактериями «цветений» воды при попадании фосфатных (включая пиррофосфаты) удобрений в естественные водоемы.

Список использованных источников

1. Румянцев, В. А. Особенности природы цианобактерий / В. А. Румянцев, Л. Н. Крюков // Общество. Среда. Развитие (Тerra Humana). – 2012. – № 1. – С. 232–238.
2. Цианобактериальное «цветение» воды – источник проблем природопользования и стимул инноваций в России / В. А. Румянцев [и др.] // Общество. Среда. Развитие (Тerra Humana). – 2011. – № 2. – С. 222–228.
3. Волошко, Л. Н. Токсичные цианобактериальные «цветения» в Красном озере (Ленинградская обл., Россия) / Л. Н. Волошко, И. Копецкий, П. Хроузек // Астраханский вестник экологического образования. – 2014. – № 2. – С. 24–36.
4. Сакун, М. В. Использование традиционных питательных сред для культивирования цианобактерий рода *Microcystis* / М. В. Сакун // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы XIII международной молодежной научно-практической конференции, Пинск, 5 апреля 2019 г. : в 3 ч. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.] ; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2019. – Ч. 3. – С. 95–96.
5. Ильючик, И. А. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*) / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с.
6. Sabour, B. Growth responses of *Microcystis ichthyoblabe* Kützing and *Anabaena aphanizomenoides* Forti (cyanobacteria) under different nitrogen and phosphorus conditions / B. Sabour, M. Loudiki, V. Vasconcelos // Chemistry and Ecology. – 2009. – Vol. 25, № 5. – P. 337–344.