

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.69

**МОДЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ
ВЛИЯНИЯ СОЛЕЙ МЕДИ И СВИНЦА НА ФИЗИОЛОГИЮ
ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ
С КАМНЯ ИСТОРИЧЕСКИХ ЗДАНИЙ****Ю.А. Петушкова, Н.Н. Колотилова, А.Ф. Лебедева, Ю.П. Петушкова***(кафедра физиологии микроорганизмов, кафедра микробиологии;
e-mail: jupponline@gmail.com)*

Исследовали эффект солей меди и свинца на степень обрастания образцов мела альго-бактериальными сообществами, выделенными с поверхности известняка памятников архитектуры государственного музея-усадьбы “Архангельское”, и физиологическое состояние накопительных культур микроводорослей. С этой целью определяли фотосинтетическую активность микроводорослей методами амперометрического определения выделения кислорода и импульсной амплитудной модуляции замедленной люминесценции хлорофилла.

Ключевые слова: микроводоросли, обрастание, памятники архитектуры, фотосинтетическая активность, амперометрический и люминесцентный методы.

Геохимический состав разрушающегося камня памятников архитектуры оказывает непосредственное влияние на видовое разнообразие и количество микроорганизмов, развивающихся на каменных поверхностях, и как следствие на степень повреждения архитектурных сооружений. Ранее было показано, что содержание элементов Zn, Cu, Pb, Ni в камне архитектурных сооружений Москвы, Московской и Ярославской областей в основном значительно выше оптимальных концентраций, необходимых для жизнедеятельности клеток [1]. В то же время количество хемолитотрофных тионовых и нитрифицирующих бактерий в ряде проб превышало 10^3 кл./г, а содержание хемоорганотрофных микроорганизмов (бактерий и микромицетов) достигало 10^8 КОЕ/г пробы. Следовательно, хемолитотрофные и хемоорганотрофные микроорганизмы, развивающиеся на поверхности камня, в основном адаптированы к повышенным концентрациям тяжелых металлов. Известно, что рост фототрофных микроорганизмов, цианобактерий и водорослей также вызывает повреждения различных строительных материалов [2].

Микроорганизмы различным образом реагируют на тяжелые металлы (ТМ) в зависимости от таксономической принадлежности. Некоторые микроорганизмы способны приспосабливаться к высоким концентрациям ионов ТМ. Этому способствует низкая проницаемость мембран для этих ионов, выведение их из клеток, а также внутриклеточное обезвреживание. Механизмы устойчивости подразделяются на специфические, зависящие от особен-

ностей воздействия ТМ на клетки, и неспецифические, проявляющиеся в любых стрессовых условиях. Так, увеличение уровня ряда ТМ стимулирует как синтез металлотионеинов в клетках, так и выделение экзометаболитов в среду культивирования [3–5].

Цель настоящей работы заключается в изучении действия солей меди и свинца на степень обрастания образцов мела альго-бактериальными сообществами, выделенными с известняка памятников архитектуры, при этом в процессе эксперимента проводили измерение скорости фотосинтетического выделения кислорода и фотосинтетической активности микроводорослей в составе этих сообществ.

Материалы и методы исследования

Накопительные культуры микроводорослей и цианобактерий, выделенные с каменных архитектурных памятников, наносили в качестве модельных экспериментов непосредственно на поверхность образцов мела, основой которого является CaCO_3 , затем помещали в среду BG-11 следующего состава (г/л): NaNO_3 — 1,5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ — 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,075; CaCl_2 — 0,036; лимонная кислота — 0,006; цитрат Fe (II) — 0,006; ЭДТА — 0,001; Na_2CO_3 — 0,02; раствор микроэлементов A5 + Co — 1 мл/л. Вода дистиллированная до 1 л; pH среды примерно 7,4. Среда используется в двух вариантах: BG_N-11 (с NaNO_3) и BG₀-11 (без NaNO_3). Состав раствора микроэлементов A5 + Co (г/л):

H_3BO_3 — 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,222; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,390; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,0494 [6] с разной концентрацией CuSO_4 или $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Флаконы с образцами выращивали при освещении лампой дневного света в режиме свет:темнота (12:12 ч). Время экспозиции составляло 4 и 7 недель. По истечении срока экспозиции визуально оценивалась интенсивность обрастания по 6-балльной шкале.

Для выделения **хемоорганотрофных бактерий** использовалась твердая агаризованная среда следующего состава (г/л): пептон — 1; дрожжевой экстракт — 1; глюкоза — 1; вода водопроводная. Количественный учет хемоорганотрофных бактерий проводили методом десятикратных разведений.

Определение фотосинтетической активности биопленки микроводорослей в модельных экспериментах осуществляли методом импульсной амплитудной модуляции [7] на приборе РАМ-2000 производства WALZ, EFFELRICH (Германия). Относительную переменную флуоресценцию хлорофилла, которая может служить индикатором фотосинтетической активности микроводорослей, определяли по формуле $(F_m - F_0)/F_m$, где F_m — максимальная, а F_0 — минимальная флуоресценция. Расчеты переменной флуоресценции проводились с помощью программы DA-2000 (WALZ). Количественный учет микроводорослей проводили в камере Горяева.

Определение скорости фотосинтетического выделения кислорода проводили амперометрическим методом путем измерения концентрации O_2 в исследуемых суспензиях клеток накопительной культуры микроводорослей при добавлении сульфата меди в различных концентрациях. Концентрация O_2 в оксиметрической ячейке объемом 2 мл регистрировали платиновым электродом закрытого типа. Клетки освещали светом от лампы накаливания при насыщающей фотосинтез интенсивности (~20 000 лк) через водяной фильтр толщиной 3 см. Электрический ток между электродами, пропорциональный изменениям концентрации O_2 в ячейке, регистрировали с помощью цифрового мультиметра фирмы METEX (модель ME-22), сигнал с которого в цифровом коде через последовательный интерфейс поступал на компьютер.

Результаты и их обсуждение

В работе использовались накопительные культуры фототрофных микроорганизмов, выделенные с каменных стен Грота, Большого дворца и Малого дворца “Каприз” — исторических сооружений XVIII—XIX вв. Государственного музея-усадьбы “Архангельское”. Ранее при обследовании камня стен этих сооружений были обнаружены участки с различным, в том числе высоким, содержанием ионов Cu, Pb и ряда других металлов [8]. Доминирующим фототрофным компонентом сообщества, развиваю-

щегося на стенах Грота, являются цианобактерии порядка *Oscillatoriales* (*Phormidium*, *Leptolyngbya*), а накопительные культуры микроорганизмов со стен обоих дворцов представлены главным образом зелеными водорослями порядка *Chroococcales*.

Для изучения эффективности различных концентраций сульфата меди были использованы пробы видимого водорослевого обрастания на поверхностях белокаменных цоколей исторических памятников. Результаты количественного определения микроорганизмов в питательной среде в присутствии сульфата меди показали, что с увеличением концентрации CuSO_4 от 0,1 г/л и выше наблюдалась тенденция к уменьшению количества клеток микроводорослей и хемоорганотрофных бактерий в накопительной культуре (табл. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации сульфата меди на рост микроводорослей и хемоорганотрофных бактерий

Концентрация CuSO_4 , г/л	Количество клеток микроводорослей в 1 мл	Количество хемоорганотрофных бактерий, КОЕ/мл
1	$7,0 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$
0,1	$9,0 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$
0,05	$1,3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$
0,01	$2,6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^6$
0,005	$3,5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$
0,001	$4,0 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$
0	$3,0 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$

При культивировании микроводорослей в присутствии CuSO_4 в концентрациях 0,001—0,005 г/л выявлено стимулирующее действие меди на рост микроводорослей (табл. 1). Следует отметить, что при концентрации 0,01 г/л морфология бактериальных колоний сильно изменилась — в контрольных образцах среди них были обнаружены как пигментированные, так и непигментированные колонии. Вероятно, концентрация 0,01 мг/мл сульфата меди оказывает ингибирующее действие на рост микроводорослей и в первую очередь на бактерии, среди которых непигментированные колонии практически не наблюдались.

При культивировании микроводорослей с концентрацией CuSO_4 1 г/л количество клеток почти не изменилось по сравнению с контролем, но все они утратили зеленую окраску и стали коричневыми. Вероятно, депигментация микроводорослей связана с утратой их жизнеспособности. Количество бактерий уменьшилось более чем в 100 раз.

Результаты эксперимента по моделированию обрастания выделенными альго-бактериальными ассоциациями образцов кубиков CaCO_3 показали, что с увеличением концентрации CuSO_4 интенсивность

роста микроорганизмов в среде и на поверхности известняка также закономерно снижалась. Однако даже при высокой концентрации в среде сульфата меди (1 г/л) на гранях ряда образцов наблюдался точечный зеленый налет. Это можно объяснить следующим образом. Во-первых, возможно, клетки потеряли способность размножаться, но остались жизнеспособными. Во-вторых, клетки остались функционально активными и даже сохранили способность размножаться, но наличие высоких концентраций ионов меди ингибирует их рост. Возможен вариант, что клетки мертвые, а следы обрастания мы видим вследствие первоначального внесения в раствор высокой концентрации посевного материала. Наконец, высокая устойчивость к ионам Cu , как и многим другим неблагоприятным факторам, может быть связана с образованием клетками агрегатов и слизистых скоплений, наиболее ярко выраженным у представителей культуры, выделенной со стен Грота. Кроме того, не исключено и неравномерное распределение CuSO_4 в образце известняка, обуславливающее наличие участков с низкой концентрацией ионов меди. Примечательно, что некоторые кубики были частично окрашены в голубой цвет, однако на гранях также присутствовал и зеленоватый налет, вызванный ростом биопленки. Таким образом, CuSO_4 в концентрации 1 г/л не полностью подавила развитие клеток.

Такая оценка не позволяет сделать заключение о физиологическом состоянии клеток альго-бактериального комплекса. Для решения этого вопроса был выбран такой показатель жизнедеятельности, как фотосинтетическая активность (ФА). Результаты показали, что ФА не зависит прямо пропорционально от интенсивности обрастания. Подавление роста и ФА зависит от срока инкубации. Следовательно, изучаемые концентрации солей тяжелых металлов не сразу, а постепенно подавляют жизнедеятельность микроводорослей. Например, при концентрации CuSO_4 1 г/л и инкубации в течение 30 сут микроводоросли, выделенные со стен Грота, сохранили высокий показатель ФА (0,38), а при инкубации в течение 50 сут их ФА была подавлена уже при концентрации 100 мг/л (рис. 1 и 2).

ФА альго-бактериального комплекса, выделенного с наружной стены Дворца "Каприз", после инкубации в растворе CuSO_4 и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации вплоть до 1 г/л в течение 30 сут не уменьшилась по сравнению с контролем (рис. 1 и 3).

Однако $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации 1 г/л все же подавляет ФА микроводорослей при сроке инкубации, составляющем 30 сут. Это было показано на альго-бактериальных сообществах, выделенных со стен Дворца (рис. 3).

Таким образом, альго-бактериальные сообщества, выделенные со стен трех памятников архитектуры, имеют различную степень устойчивости к воздействию CuSO_4 и $(\text{PbNO}_3)_2$. При этом со-

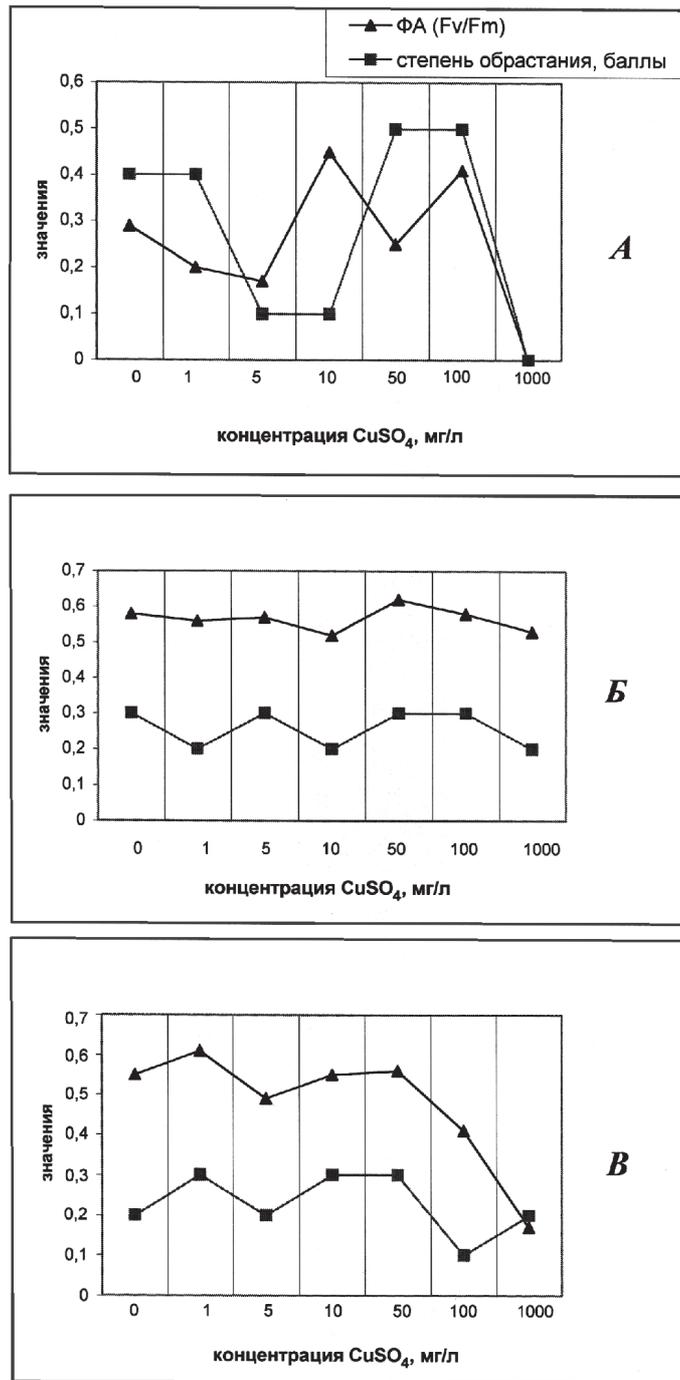


Рис. 1. Влияние различных концентраций сульфата меди на фотосинтетическую активность микроводорослей и интенсивность обрастания образцов мела накопительными культурами, выделенными с поверхности известняка исторических зданий: А — Грот; Б — Малый дворец "Каприз"; В — Большой дворец. Время экспозиции 30 сут

став альгокомпонентов микробных сообществ практически идентичен.

Изучение влияния различных концентраций сульфата меди на фотосинтетическое выделение кислорода накопительной культурой микроводорослей определялось после преинкубации клеток накопительной культуры с CuSO_4 в течение двух различных периодов времени (табл. 2). Как показано,

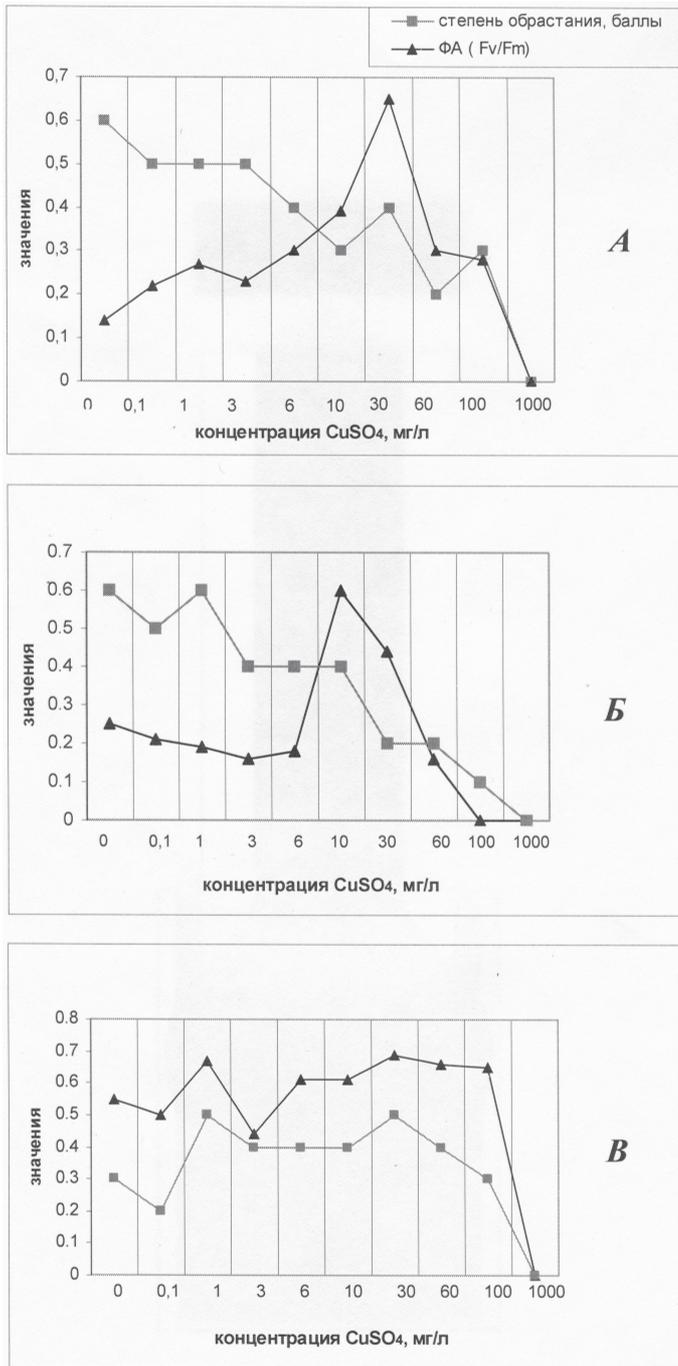


Рис. 2. Влияние различных концентраций сульфата меди на фотосинтетическую активность микроводорослей и интенсивность обрастания образцов мела накопительными культурами, выделенными с поверхности известняка исторических зданий: **А** — Грот; **Б** — Грот; **В** — Большой дворец. Время экспозиции 50 сут

с увеличением концентрации сульфата меди в оксиметрической ячейке с культурой микроводорослей скорость фотосинтетического выделения кислорода незначительно уменьшается. Концентрации сульфата меди 0,00125 мг/мл и 0,005 мг/мл не оказывали заметного действия на скорость выделения кислорода. Наибольший ингибирующий эффект наблюдался при максимальной из использован-

ных концентраций сульфата меди — 0,02 мг/мл. При этой концентрации скорость выделения кислорода после 30-минутной преинкубации культуры микроводорослей снизилась на 30%.

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости накопительной культуры водорослей к высоким концентрациям меди. Сходный ингибирующий эффект соли меди оказывают на биопленки микроводоросли *Chlorella*, при этом элиминиру-

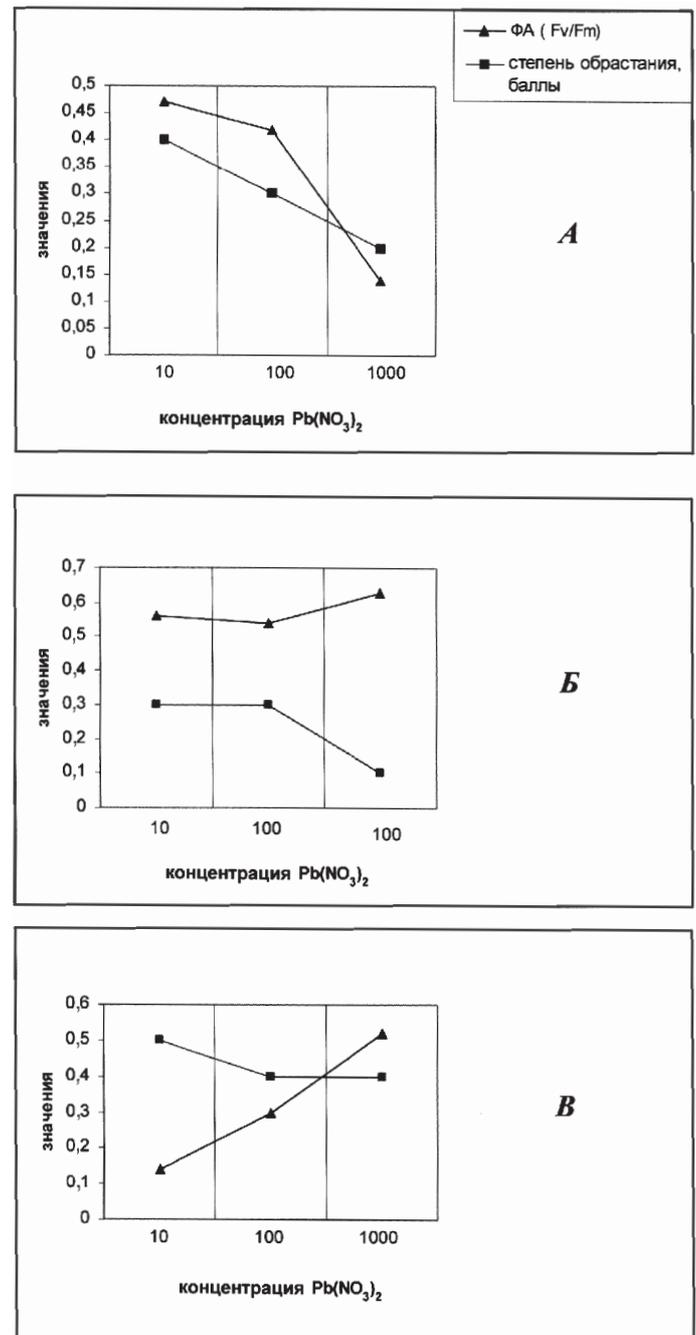


Рис. 3. Влияние различных концентраций нитрата свинца на фотосинтетическую активность микроводорослей и интенсивность обрастания образцов мела накопительными культурами, выделенными с поверхности известняка исторических зданий: **А** — Большой дворец; **Б** — Малый дворец “Каприз”; **В** — Грот. Время экспозиции 30 сут

Таблица 2

Влияние различных концентраций CuSO₄ на фотосинтетическое выделение O₂ накопительной культурой микроводорослей

Концентрация CuSO ₄ , мг/мл	Скорость выделения O ₂ после преинкубации, %	
	10 мин	30 мин
0	100	100
0,00125	100	95
0,005	90	83
0,02	75	70

Примечание. 100% скорость выделения O₂ за вычетом темного поглощения O₂ составляет ~65 мкмоль/мг хлорофилла · ч.

ются наиболее чувствительные виды, но биопленки продолжают функционировать [9].

Таким образом, можно заключить, что действие солей тяжелых металлов подавляет рост мик-

роводорослей, замедляет процессы обрастания камня альго-бактериальными сообществами. Проследивается тенденция снижения степени обрастания с увеличением концентрации солей металлов в растворе. Однако фотосинтетическая активность и фотосинтетическое выделение O₂ устойчивыми культурами микроводорослей, развивающихся на поверхности мела, первое время остаются столь же высокими, как и в контроле. Впоследствии клетки частично теряют фотосинтетическую активность, следовательно, изучаемые смешанные культуры микроводорослей не являются вполне устойчивыми к высоким концентрациям CuSO₄ и (PbNO₃)₂.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам кафедры биофизики биологического факультета МГУ Г.П. Кукарских и Т.Е. Кренделевой за помощь в ходе исследования фотосинтетической активности методом импульсной амплитудной модуляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петушкова Ю.А., Крупина М.В., Петушкова Ю.П., Гусев М.В. Биогеохимическое исследование известняка памятников архитектуры // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2005. № 2. С. 23—30.
 2. Ortega-Calvo J.J., Hernandez-Marine M., Saiz-Jimenez C. Biodeterioration of Building Materials by Cyanobacteria and Algae // International Biodeterioration. 1991. Vol. 28. P. 165—185.
 3. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Изменения редокс-потенциала и содержания углеводов в среде при периодическом и диализном культивировании цианобактерии *Anacystis nidulans* и бактерии *Pseudomonas diminuta* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2002. № 2. С. 24—29.
 4. Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л. Значение глютатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2003. № 3. С. 29—37.

5. Vanella R., Verma S.K. Co²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺-accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis* // Biotechnol. Prog. 2006. Vol. 24 (5). P. 1282—93.
 6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. L.R. Boone, R.W. Castenholz. Vol. 1. New York; Heidelberg; Berlin, 2001. P. 485—487.
 7. Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. Continuous Recording of Photochemical and Non Photochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching with a New Type of Modulation Fluorometer // Photosynth. Res. 1986. Vol. 10. P. 51—62.
 8. Петушкова Ю.П., Крупина М.В., Колотилова Н.Н., Гусев М.В. Биогеохимическое исследование "Грота" — памятника архитектуры XVIII—XIX веков дворцово-паркового ансамбля "Архангельское" // Мат-лы I Международ. симпози. "Биокосные взаимодействия: жизнь и камень". СПб., 2002. С. 233—237.
 9. Watanabe T., Takihaba N., Hanada S., Aoyagi H., Watanabe Y., Ohmura N., Saiki H., Tanaka H. Symbiotic association in *Chlorella* culture // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. Vol. 52 (2). P. 187—96.

Поступила в редакцию 18.02.09

THE ACTION OF CUPREOUS AND PLUMBIC SALTS ON PHYSIOLOGY OF ISOLATED FROM STONE HISTORICAL BUILDINGS PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS IN SIMULATION EXPERIMENTS

Ju.A. Petushkova, N.N. Kolotilova, A.F. Lebedeva, Ju.P. Petushkova

The paper presents the results of studies of epilithic phototrophic microorganisms colonization on CaCO₃-containing samples (cubes of a chalk) in the nutrient medium with different concentrations of cupreous and plumbic salts. The fluorescens pulse amplitude modulation as well as the amperometric technique were used to control the action of Cu²⁺ and Pb²⁺ on the photosynthetic activity of enrichment cultures isolated from limestone of the Archangelskoe estate-museum historical buildings (XVIII—XIX c.).

Key words: *microalgae, fouling, architectural building, photosynthetic activity, amperometric and luminescent methods.*

Сведения об авторах

Петушкова Юлия Алексеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-13-75; e-mail: jupponline@gmail.com

Колотилова Наталья Николаевна — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-54-83; e-mail: kolotilova@mail.ru

Лебедева Александра Федоровна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Петушкова Юлия Павловна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-13-75; e-mail: jupponline@gmail.com