

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой,
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

Е. А. Бессолицына

БИОЛОГИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Конспект лекций

Учебно-методическое пособие

Киров 2012

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Е. А. БЕССОЛИЦЫНА

БИОЛОГИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Конспект лекций

Учебно-методическое пособие

Киров

2012

УДК

К

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.68 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

Бессолицына Е. А.

К

Биология цианобактерий конспект лекций: учебно-методическое пособие /

Е. А. Бессолицына – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2012. – 51 с.

УДК

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.68 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения для изучения дисциплины «Биология цианобактерий».

Тех. редактор Е. В. Кайгородцева

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2012

Оглавление

Систематическое положение цианобактерий. Особенности морфологии.....	6
Систематическое положение цианобактерий.....	6
Культурально - морфологические свойства. Особенности размножения.....	14
Распространенность цианобактерий в природе. Экологическая роль цианобактерий	24
Устойчивость цианобактерий к загрязнениям и механизмы адаптации к ним.....	32
Использование цианобактерий в составе биопрепаратов	35
Особенности культивирования цианобактерий.....	42
Альго-цианобактериальные группировки почв.....	48

Систематическое положение цианобактерий. Особенности морфологии

Систематическое положение цианобактерий

Синезеленые водоросли насчитывают до 1500 видов. В разных литературных источниках у разных авторов они упоминаются под разными названиями: цианеи, цианобионты, цианофиты, цианобактерии, цианеллы, синезеленые водоросли, синезеленые водоросли, цианофицеи. Развитие исследований приводит некоторых авторов к изменению взглядов на природу этих организмов и, соответственно, к изменению названия. Так, например, еще в 2001 г. В.Н. Никитина относила их к водорослям и называла цианофитами, а в 2003 г. уже определила их как цианопрокариоты. В основном название выбирается в соответствии с классификацией, предпочтение которой отдает тот или иной автор.

Чем же вызвано наличие у организмов одной группы такого количества названий, причем такие названия как цианобактерии и синезеленые водоросли противоречат друг другу? По отсутствию ядра они сближаются с бактериями, а по наличию хлорофилла а и способности синтезировать молекулярный кислород - с растениями. По мнению Э.Г. Кукка, «крайне своеобразное строение клеток, колоний и нитей, интересная биология, большой филогенетический возраст - все эти признаки...дают основу для множества трактовок систематики этой группы организмов». Кукк приводит такие их названия как синезеленые водоросли (Cyanophyta), фикохромовые дробянки (Schizophyceae), слизевые водоросли (Mucorphyceae).

Систематика - один из основных подходов к изучению мира. Ее целью является поиск единства в видимом разнообразии природных явлений. Проблема классификации в биологии всегда занимала и занимает особое положение, что связано с гигантским разнообразием, сложностью и постоянной изменчивостью биологических форм живых организмов. Цианобактерии являются ярчайшим примером полисистемности.

Первые попытки построения системы синезеленых относятся к XIX в. (Агард - 1824 г., Кютцинг - 1843, 1849 гг., Тюрэ - 1875 г.). Дальнейшую разработку системы продолжил Кирхнер (1900 г.). С 1914 г. началась существенная переработка системы,

и был опубликован целый ряд новых систем Cyanophyta (Еленкин - 1916, 1923, 1936; Борци - 1914, 1916, 1917; Гейтлер - 1925, 1932 гг.). Самой удачной была признана система А.А. Еленкина, опубликованная в 1936 г. Эта классификация сохранилась до настоящего времени, так как оказалась удобной для гидробиологов и микропалеонтологов.

Схема Определителя пресноводных водорослей СССР была основана на системе Еленкина, в которую были внесены незначительные изменения. В соответствии со схемой Определителя, синезеленые были отнесены к типу Cyanophyta, разделены на три класса (Chroococceae, Chamaesiphoneae, Hormogoneae). Классы разделены на порядки, порядки - на семейства. Эта схема определяла положение синезеленых в системе растений.

По классификации водорослей Паркера (1982 г.), синезеленые относятся к царству Procaruyota, отделу Cyanophycota, классу Cyanophyceae.

Международный кодекс ботанической номенклатуры в свое время был признан неприемлемым для прокариот, и на его основе был разработан ныне действующий Международный кодекс номенклатуры бактерий - МКНБ (International Code of Nomenclature of Bacteria). Однако цианобактерии рассматриваются как организмы «двойной принадлежности» и могут описываться по правилам как МКНБ, так и Ботанического кодекса. В 1978 г. Подкомитетом по фототрофным бактериям Международного комитета систематической бактериологии было предложено подчинить номенклатуру Cyanophyta правилам «Международного кодекса номенклатуры бактерий» и до 1985 г. опубликовать списки заново одобренных наименований этих организмов. Н.В. Кондратьева в статье провела критический анализ этого предложения. Автор считает, что предложение бактериологов «ошибочно и может иметь вредные последствия для развития науки». В статье приведена классификация прокариот, принятая автором. Согласно этой классификации, синезеленые относятся к надцарству Procaruyota, царству Photoprocaruyota, подцарству Procaruyophycobionta, отделу Cyanophyta.

С.А. Баландин с соавторами, характеризуя царство Растения, относит отдел Бактерии (Bacteriophyta) к низшим растениям, а отдел Синезеленые водоросли (Cyanophyta - и не иначе) - к водорослям. При этом остается неясным, что за таксономическая группа Водоросли - возможно, подцарство. В то же время, описывая

отдел Бактерии, авторы указывают: «При классификации бактерий выделяют несколько классов: настоящие бактерии (эубактерии), миксобактерии, ... цианобактерии (синезеленые водоросли)». Вероятно, таксономическая принадлежность цианобактерий для авторов - вопрос открытый.

В литературных источниках приводится множество классификаций, в основе которых лежит деление на группы по фенотипическим признакам. Разные систематики по-разному оценивают ранг цианобактерий (или синезеленых?) - от класса до самостоятельного царства организмов. Так, по трехцарственной системе Хекела (1894 г.), все бактерии относятся к царству Protista. Система из пяти царств по Уиттэйкеру (1969 г.) относит цианобактерии к царству Monera. По системе организмов Тахтаджяна (1973 г.), они относятся к надцарству Procargota, царству Bacteriobiota. Однако в 1977 г. А.Л. Тахтаджян относит их к царству Дробянки (Murchota), подцарству Цианеи, или Сине-зеленые водоросли (Cyanobionta), отделу Cyanophyta. При этом автор указывает, что многие для обозначения царства вместо Murchota «употребляют малоудачное название Monera, предложенное еще Э. Геккелем для якобы безъядерного «рода» Protamoeba, который оказался всего лишь безъядерным фрагментом обыкновенной амебы». В соответствии с правилами МКНБ, синезеленые водоросли входят в надцарство Prokaryota, царство Murchota, подцарство Oxyphotobacteriobionta как отдел Cyanobacteria. Пятицарственная система классификации по Маргелис и Шварцу относит цианобактерии к царству Prokariotae. Шестицарственная систематика Кавалер-Смита относит филум Cyanobacteria к империи Procargota, царству Bacteria, подцарству Negibacteria.

В современной классификации микроорганизмов принята следующая иерархия таксонов: домен, филум, класс, порядок, семейство, род, вид. Таксон домена был предложен как более высокий по отношению к царству, чтобы подчеркнуть значение подразделения мира живого на три части - Archaea, Bacteria и Eukarya. В соответствии с такой иерархией цианобактерии относят к домену Bacteria, филуму B10 Cyanobacteria, который, в свою очередь, разделяют на пять подсекций.

Схема National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Browser (2004 г.) определяет их как тип и относит к царству Monera.

В 70-е гг. прошлого века К. Вёзе была разработана филогенетическая классификация, в основе которой лежит сопоставление всех организмов по одному

гену малой рРНК. Согласно этой классификации, цианобактерии составляют отдельную ветвь 16S-рРНК дерева и относятся к царству Eubacteria. Позже (1990 г.) Вёзе определил это царство как Bacteria, разделив все организмы на три царства - Bacteria, Archaea и Eukarya.

Классификация цианобактерий находится в стадии развития и, по существу, все приводимые рода и виды в настоящее время следует рассматривать как временные и подлежащие значительной модификации.

Основным принципом классификации все еще является фенотипический. Однако такая классификация удобна, так как позволяет определять образцы достаточно простым способом.

Наиболее популярной является таксономическая схема Определителя бактерий Берджи, которая также разделяет бактерии на группы по фенотипическим признакам.

Согласно изданию «Руководства по систематике бактерий Берджи», все доядерные организмы были объединены в царство Procaryotae, которое подразделялось на четыре отдела. Цианобактерии отнесены к отделу 1 - Gracilicutes, к которому отнесены все бактерии, имеющие грамтрицательный тип клеточной стенки, классу 3 - Oxyphotobacteria, порядку Cyanobacteriales.

Девятое издание «Определителя бактерий Берджи» определяет отделы как категории, каждая из которых делится на группы, не имеющие таксономического статуса. Любопытно, что некоторые авторы по-разному трактуют классификацию одного и того же издания «Определителя бактерий Берджи». Например, Г.А. Заварзин - четко в соответствии с приведенным в самом издании делением на группы: цианобактерии входят в 11 группу - кислородные фототрофные бактерии. М.В. Гусев и Л.А. Минеева все группы бактерий до девятой включительно характеризуют в соответствии с Определителем, а затем следуют радикальные расхождения. Так, в 11 группу авторы включают эндосимбионтов простейших, грибов и беспозвоночных, а оксифотобактерии оказываются отнесенными к 19 группе.

Согласно последнему изданию руководства Берджи, цианобактерии входят в домен Bacteria.

Таксономическая схема «Определителя бактерий Берджи» основана на нескольких классификациях: Риппка, Друэ, Гейтлера, классификации, созданной в результате критической переоценки системы Гейтлера, классификации Анагностидиса

и Комарека.

Система Друэ основана в основном на морфологии организмов из гербарных образцов, что делает ее неприемлемой для практики. Сложная система Гейтлера основана почти исключительно на морфологических признаках организмов из природных образцов. Путем критической переоценки родов Гейтлера создана еще одна система, основанная на морфологических признаках и способах размножения. В результате критической переоценки родов Гейтлера создана система, основанная, прежде всего, на морфологических признаках и способе размножения цианобактерий. Путем проведения сложной модификации системы Гейтлера с учетом данных по морфологии, ультраструктуре, способах размножения, изменчивости создана современная расширенная система Анагностидиса и Комарека. Наиболее простая система Риппка, приведенная в «Определителе бактерий Берджи», основана почти исключительно на изучении лишь тех цианобактерий, которые имеются в культурах. Данная система использует морфологические признаки, способ размножения, ультраструктуру клеток, физиологические особенности, химический состав и иногда генетические данные. Эта система, как и система Анагностидиса и Комарека, является переходной, так как приближается отчасти к генотипической классификации, т.е. отражает филогению и генетическое родство.

По таксономической схеме Определителя бактерий Берджи, цианобактерии делятся на пять подгрупп. К I и II подгруппам относятся одноклеточные формы или нитчатые колонии клеток, объединенных наружными слоями клеточной стенки или гелеподобным матриксом. Бактерии каждой подгруппы различаются способом размножения. К III, IV и V подгруппам относятся нитчатые организмы. Бактерии каждой подгруппы различаются между собой способом деления клеток и, как результат, формой трихомов (разветвленные или неразветвленные, однорядные или многорядные). В каждую подгруппу входит несколько родов цианобактерий, а также, наряду с родами, так называемые «группы культур», или «сверхроды», которые в дальнейшем, как предполагается, могут быть разделены на ряд дополнительных родов.

Так, например, «группа культур» *Cyanothese* (подгруппа I) включает семь изученных штаммов, выделенных из разных условий обитания. В целом первая подгруппа включает девять родов (*Chamaesiphon*, *Cyanothese*, *Gloeobacter*, *Microcystis*,

Gloeocapsa, Gloeothese, Muxobaktron, Synechococcus, Synechocystis). Подгруппа II включает шесть родов (Chroococcidiopsis, Dermocarpa, Dermocarpella, Muxosarcina, Pleurocapsa, Xenococcus). Подгруппа III включает девять родов (Arthrospira, Crinalium, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Trichodesmium). Подгруппа IV включает семь родов (Anabaena, Aphanizomenon, Cylandrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema, Calothrix). Подгруппа V включает одиннадцать родов потенциально нитчатых цианобактерий, отличающихся высокой степенью морфологической сложности и дифференцировки (многорядные нити). Это рода Chlorogloeopsis, Fisherella, Geitleria, Stigonema, Cyanobotrys, Loriella, Nostochopsis, Mastigocladopsis, Mastigocoleus, Westiella, Halosiphon.

Некоторые авторы на основании анализа гена 16S рРНК относят к цианобактериям и прохлорофитов (порядок Prochlorales), сравнительно недавно открытую группу прокариот, осуществляющих, как и цианобактерии, кислородный фотосинтез. Прохлорофиты во многом схожи с цианобактериями, однако, в отличие от них, наряду с хлорофиллом а содержат хлорофилл b, не содержат фикобилиновых пигментов.

В систематике цианобактерий еще достаточно много неясного, большие разногласия возникают на каждом уровне их исследования. Но, как полагает Кукк, «виноваты» в такой судьбе сине-зеленые водоросли сами».

В течение длительного времени альгологами было описано около 170 родов и больше 1000 видов сине-зеленых водорослей [3]. Все еще ведется работа по созданию новой систематики цианобактерий, основанной на изучении чистых культур. Уже получено более 300 чистых штаммов цианобактерий. Для классификации используются постоянные морфологические признаки, закономерности развития культуры, особенности клеточной ультраструктуры, величина и нуклеотидная характеристика генома, особенности углеродного и азотного метаболизма и ряд других характеристик].

Начатая работа по классификации цианобактерий в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий привела к выделению 5 основных таксономических групп в ранге порядков, различающихся морфологическими признаками (табл.1). Цианобактерии отнесены к царству *Prokaryotae*, отделу *Gracilicutes*, классу *Oxyphotobacteria*, порядку *Cyanobacteriales*. Для характеристики

выделенных родов привлечены также данные, полученные при изучении клеточной ультраструктуры, генетического материала, физиолого-биохимических свойств.

Таблица 1 – Основные таксономические группы цианобактерий

Одноклеточные формы: одиначные клетки или		Многклеточные формы: нитчатые		
Пор. Chroococcales	Пор. Pleurocapsales	Пор. Oscillatoriales	Пор. Nostocales	Пор. Stigoneomatales
Размножение бинарным делением в одной или более плоскостях или почкованием	Размножение множественным делением или чередованием бинарного множественного деления	Трихомы неветвящиеся, состоят из одного ряда только вегетативных клеток. Рост трихома — делением клеток в одной плоскости	В неветвящихся одно рядных трихомах помимо вегетативных образуются дифференцированные клетки: гетероцисты и иногда акинеты. Рост трихома — делением клеток в одной плоскости	Те же признаки, что и у представителей пор. Nostocales. Отличительный признак: способность вегетативных клеток трихома к делению более чем в одной плоскости, приводящему к появлению многорядных трихомов или трихомов с

В порядок Chroococcales наиболее примитивен. Сюда включены одноклеточные цианобактерии, существующие в виде одиночных клеток или формирующие колонии. Для большинства представителей этой группы характерно образование чехлов, окружающих каждую клетку и, кроме того, удерживающих вместе группы клеток, т. е. участвующих в формировании колоний. Цианобактерии, клетки которых не образуют чехлов, легко распадаются до одиночных клеток. Размножение осуществляется бинарным делением в одной или нескольких плоскостях, а также почкованием.

К порядку *Oscillatoriales* отнесены многоклеточные формы, имеющие нитчатое строение. Отличаются от предыдущих порядков прежде всего тем, что гетероцисты всегда отсутствуют. К порядку *Oscillatoriales* относятся нити, состоящие из одного ряда трихомов, с чехлами или без чехлов. Трихомы бывают симметричные или асимметричные (суживающиеся от основания к вершине).

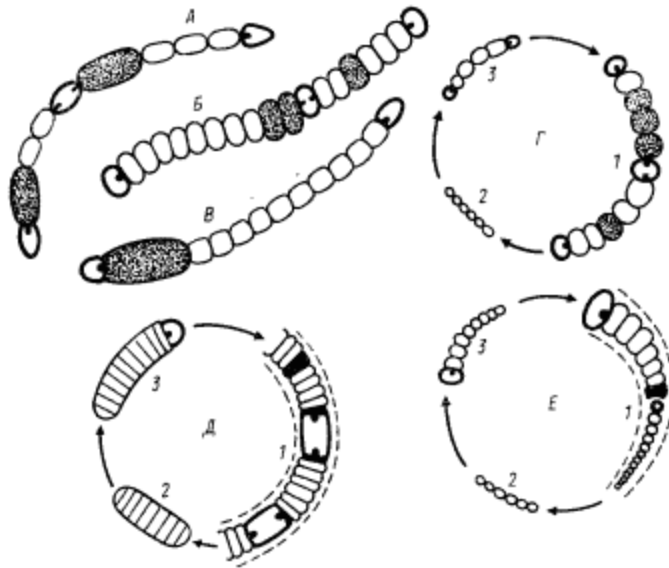


Рисунок 1 Цианобактерии, отнесенные к порядку Nostocales: А — *Anabaena*; Б — *Nodularia*; В — *Cylindrospermum*; Г — *Nostoc*; Д, — *Scytonema*; Е — *Calothrix*: 1 — трихом в зрелом состоянии; 2 — гормогоний; 3 — молодой трихом

Порядок *Nostocales* представлен цианобактериями с однорядными неветвящимися нитями, рост которых происходит путем деления клеток в одной плоскости.

В трихомах, растущих в отсутствие связанного азота, происходит дифференциация клеток с образованием гетероцист. У некоторых форм встречаются также акинеты.

Гетероцисты изображены в виде клеток с толстой клеточной стенкой и полярными гранулами; акинеты — в виде темных клеток. Прерывистой линией вдоль трихома обозначен чехол.

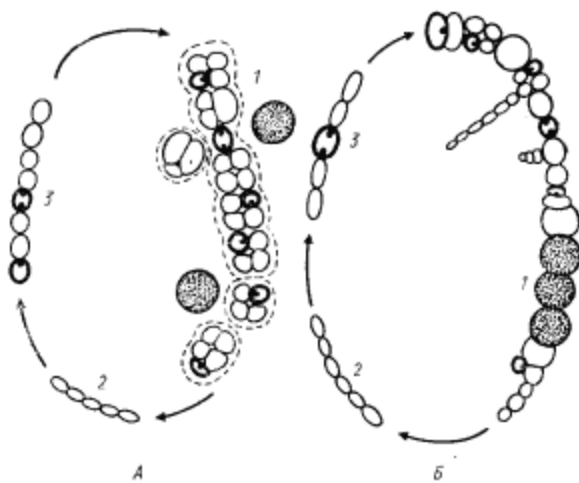


Рисунок 2:
Цианобактерии
порядка Stigonematales: А — *Chlorogloeopsis*; Б —

В порядок *Stigoneomatales* объединены цианобактерии, отличающиеся от представителей предыдущего класса способностью вегетативных клеток трихома к делению более чем в одной плоскости.

Культурально - морфологические свойства. Особенности размножения

Цианобактерии — морфологически разнообразная группа грамотрицательных прокариот, включающая одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы. Клетки — сферические, палочковидные или изогнутые; одиночные или образующие скопления, удерживаемые после ряда делений вместе с помощью окружающего их общего чехла. Многоклеточные формы имеют нитевидное строение. Единицей их структуры служит нить (трихом, или филамент). Нити бывают простые или ветвящиеся. Простые нити состоят из одного ряда клеток (однорядные трихомы), имеющих одинаковые размеры, форму и строение, или клеток, различающихся по этим параметрам. Ветвящиеся трихомы возникают в результате разных причин, в связи с чем различают ложное и истинное ветвление. К истинному ветвлению приводит способность клеток трихома делиться в разных плоскостях, в результате чего возникают многорядные трихомы или однорядные нити с однорядными же боковыми ветвями. Ложное ветвление трихомов не связано с особенностями деления клеток внутри нити, а есть результат прикрепления или соединения разных нитей под углом друг к другу.

В процессе жизненного цикла некоторые цианобактерии формируют дифференцированные единичные клетки или короткие нити, служащие для размножения (баеоциты, гормогонии), выживания в неблагоприятных условиях (споры, или акинеты) или азотфиксации в аэробных условиях (гетероцисты).

Для разных представителей этой группы прокариот характерна способность к скользящему движению, осуществляющемуся по твердому субстрату без помощи жгутиков. Оно свойственно как нитчатым формам (трихомы и/или гормогонии), так и одноклеточным (баеоциты).

Известны разные способы размножения цианобактерий. Деление клеток происходит путем равновеликого бинарного деления, сопровождающегося образованием поперечной перегородки или перетяжки; неравновеликого бинарного деления (почкования); множественного деления. Бинарное деление может происходить только в одной плоскости, что у одноклеточных форм приводит к образованию цепочки клеток, а у нитчатых — к удлинению однорядного трихома. Деление в нескольких плоскостях ведет у одноклеточных цианобактерий к

формированию скоплений правильной (кубической) или неправильной формы, а у нитчатых — к возникновению многорядного трихома (если к такому делению способны почти все вегетативные клетки нити) или однорядного трихома с боковыми однорядными ветвями (если способность к делению в разных плоскостях обнаруживают только отдельные клетки нити). Размножение нитчатых форм цианобактерии осуществляется также с помощью обрывков трихома, состоящих из одной или нескольких клеток, у некоторых — также гормогониями, отличающимися по целому ряду признаков от трихомов, и в результате прорастания акинет в благоприятных условиях.

Большинство цианобактерий - облигатные фототрофы, неспособные к жизни в темноте за счет органического субстрата, хотя есть и исключения. Среди цианобактерий много форм, способных к азотфиксации. Под азотфиксацией понимают возможность использования организмом молекулярного азота, который содержится в огромном количестве в атмосфере. Почему-то никакие эукариоты не обладают способностью к азотфиксации, это привилегия некоторых прокариот. Азотфиксация связана с активностью ферментного комплекса нитрогеназы. При этом происходит восстановление азота до аммиака, затем образуются азотсодержащие органические молекулы. Это сугубо восстановительный процесс, в присутствии молекулярного кислорода нитрогеназа инактивируется. Между тем, цианобактерии живут в присутствии молекулярного кислорода, более того, они его образуют. Поэтому формы цианобактерий, способные к азотфиксации, должны как-то защитить свой фермент от кислорода. Некоторые виды решают эту проблему таким образом, что фиксация азота у них происходит при отсутствии фотосинтеза, в ночное время, или существует эндогенный ритм чередования фотосинтеза и азотфиксации. Так обстоит дело, например, у морской планктонной цианобактерии *Trichodesmium*, массы которой населяют теплые моря и океаны и фиксация азота которой имеет огромное значение для жизни океана. У других цианобактерий азотфиксация происходит в специализированных клетках - гетероцистах. Гетероцисты обладают дополнительными слоями оболочки, защищающими их от проникновения кислорода извне. В гетероцистах не идет процесс фотосинтеза с образованием кислорода, зато активно идет процесс азотфиксации. Образующиеся соединения связанного азота передаются соседним вегетативным клеткам через микроплазмодесмы, а от них

поступает органический субстрат, необходимый для фиксации азота. Гетероцисты обычно неспособны к росту и делению и со временем отмирают, их единственная функция - фиксация азота. Таким образом, это единственный пример прокариотического многоклеточного организма, так как происходит разделение функций между разными клетками. Это тоже уникальная особенность цианобактерий.

Различные виды цианобактерий обладают разнообразными адаптационными механизмами, определяющими успешное развитие их в тех или иных условиях окружающей среды. Некоторые формы *Scytonema*, например, образуют пигмент, концентрирующийся на поверхности клетки и эффективно защищающий ее от ультрафиолетовых лучей, что определяет возможность развития этой цианобактерии при прямом солнечном освещении.

В отношении тонкой структуры клеток цианобактерии во многом сходны с граммотрицательными бактериями. Помимо внешней мембраны, типичной для граммотрицательных прокариот, у некоторых цианобактерий обнаружен так называемый «S-слой», который состоит из белковых глобул.

Важным приспособлением против засухи является обильное образование слизи – чехлов, окружающих колонии, и более оформленных в виде перидерма.

Многие представители порядка *Nostocales* образуют гелеподобные или слизистые чехлы либо внеклеточный матрикс, консистенция которого может быть от плотной и кожистой до очень мягкой и слизистой.

Последние данные показывают, что слизь структурирована и представляет собой единую систему с клеткой, хотя по виду это внешнее образование. Так исследования, представленные по внешним покровам *N. commune*, показали наличие в слизи микрофибрилл, плотного перидерма, что свидетельствует о едином плане строения слизи с клеткой.

Слизь является естественной экологической нишей для гетеротрофной микрофлоры, сопутствующей цианобактериям. По мнению многих исследователей, связь между цианобактериями и бактериальными спутниками соответствует понятиям симбиоза. Но вопрос этот остается до сих пор дискуссионным.

Фотосинтетический аппарат представлен тилакоидами, которые либо расположены параллельно плазматической мембране, либо сильно извиты и помещаются в периферических участках цитоплазмы. Тилакоидная мембрана

содержит хлорофилл а, Р-каротин и оксокаротиноиды, такие как миксоксантофилл, эхиненон и зеаксантин, а также компоненты цепи фотосинтетического переноса электронов. Отличительной особенностью цианобактерий (и красных водорослей) является наличие фикобилисом. Это дисковидные образования, прилегающие снаружи к тилакоидам. Они состоят из фикобилипротеинов, чаще всего - фикоцианина (75%), аллофикоцианина (12%) и фикоэритрина, а также бесцветных полипептидов, которые все вместе составляют 12%. Фикобилипротеины в свою очередь состоят из белка и простетических групп - фикоцианобилина или фикоэритробилина. По своей функции это светособирающие пигменты цианобактерий; поглощенная ими энергия передается главным образом фотосистеме II. Хлорофилл а снабжает энергией только фотосистему I. Фикобилисомы могут составлять до половины всего белка клетки.

Фикобилины во многом сходны с желчными пигментами. Их синтез начинается с образования порфирина; при размыкании кольца углерод из метилового мостика выделяется в виде CO. Синтез фикобилинов - один из немногих известных процессов, при которых образуется окись углерода.

Известна лишь одна цианобактерия, у которой фотосинтезирующий аппарат устроен несколько иначе. Это *Gloeobacter violaceus*. У данной одноклеточной цианобактерии тилакоиды не обнаружены. Основные компоненты фотосинтезирующего аппарата, видимо, находятся в цитоплазматической мембране. Около цитоплазматической мембраны, перпендикулярно ей, расположены цилиндрические образования шириной 10-12 и 50-70 нм, которые представляют собой фикобилисомы.

ДНК цианобактерий располагается обычно в центральной области клетки, называемой нуклеоплазмой. Величина генома у этих микроорганизмов составляет от 1,6 до $8,6 \cdot 10^9$ Д. У одноклеточных форм она не превышает $4,8 \cdot 10^9$ Д.

Некоторые цианобактерии образуют газовые вакуоли, проявляя при этом сходство с рядом других прокариот. Образование газовых вакуолей зависит от условий роста культур этих микроорганизмов и стадий их развития. Есть данные, что *Nostoc muscorum* содержит газовые вакуоли в тех случаях, когда рост при высокой интенсивности света. Полагают, что присутствие газовых вакуолей ведет к уменьшению поглощения пигментами света и предупреждает тем самым разрушение

некоторых компонентов клеток. Но главное значение газовых вакуолей заключается в поддержании клеток во взвешенном состоянии, так как уменьшается их плотность.

У ряда цианобактерий выявлено присутствие в клетках полиэдрических образований, называемых карбоксисомами.

Кроме того, цианобактерии могут содержать включения запасных веществ, в частности, гликогенподобного углевода. Запасным веществом, встречающимся только у цианобактерий, являются гранулы цианофицина. Они связывают вещества, окрашивающие белки, и это выдает их полипептидную природу.

У полипептида, построенного из остатков аспарагиновой кислоты, все свободные карбоксильные группы последней связаны с аргинином; таким

образом, молекула цианофицина состоит из аспартата и аргинина в соотношении 1:1. Этот полимер, очевидно, служит запасным источником азота; при недостатке азота количество полимера убывает, а при добавлении

в среду источника азота оно вновь возрастает. Цианофицин накапливается главным образом в гетероцистах. Он может также служить энергетическим резервом (хотя и незначительным), так как аргинин и в анаэробных условиях расщепляется с образованием орнитина и карбамоил-фосфата, что, в конечном счете, приводит к регенерации АТФ. Гетероцисты, образуемые рядом нитчатых цианобактерий, отличаются от вегетативных клеток, из которых они формируются, наличием более толстой оболочки. В составе оболочки, окружающей гетероцисты, обнаружен внутренний слой из гликолипидов и внешний из полисахаридов. В гетероцистах обычно отсутствуют фикобилисомы и фикобилипротеины, а также запасные вещества. Они сохраняют связь с другими клетками, однако не способны делиться и осуществляют фотосинтез без выделения молекулярного кислорода. Кроме того, гетероцисты активно фиксируют молекулярный азот и способны поглощать O_2 . Превращение отдельных вегетативных клеток в гетероцисты происходит, когда в среде нет в достаточном количестве аммония и некоторых других соединений, используемых цианобактериями в качестве источников азота.

Покоящимися клетками некоторых цианобактерий, обладающими повышенной устойчивостью к ряду неблагоприятных факторов (высушиванию, пониженным температурам), являются акинеты. Они, как правило, заметно крупнее вегетативных клеток, имеют продолговатую или сферическую форму, гранулированное содержимое

и толстую оболочку. Образование акинет происходит в период замедления роста и начинается с увеличения клеточных размеров, при этом в цитоплазме происходит накопление гранул запасных веществ (гликогеновых, полифосфатных и особенно крупных цианофициновых), а также карбоксисом. Одновременно происходит утолщение пептидогликанового слоя клеточной стенки и уплотнение слизистого чехла за счет отложения в нем электронно-плотного фибриллярного материала полисахаридной природы. Оболочки акинет содержат больше липидов и полисахаридов, а цитоплазма - меньше воды, чем вегетативные клетки. В цитоплазме при формировании акинет отмечается увеличение содержания ДНК, рибосом, но уменьшение количества хлорофилла и фикобилиновых пигментов. Скорость фотосинтеза в акинетах ниже, а дыхание выше, чем в вегетативных клетках.

Прорастание акинет происходит иногда вскоре после их образования или только после перенесения в свежую питательную среду и может осуществляться двумя путями: иногда в акинете на одном из полюсов формируется пора, через которую выходит проросток, или же прорастание происходит в результате разрыва оболочки акинеты.

Гормогонии - короткие отрезки, получающиеся при разрыве длинных трихом. Они служат для размножения. При образовании гормогониям осцилляториям приходится жертвовать по меньшей мере одной клеткой трихомы, так как клетки связаны общим пептидогликановым слоем, который не может быть разорван на границе клеток. В этом случае говорят о трансцеллюлярном разрыве.

Размножаются цианобактерии главным образом делением клетки надвое: одноклеточные особи таким образом увеличивают свою численность, колонии - объем, а нити удлиняются и разветвляются. Споры, способные переносить длительный период покоя, прорастая, дают новую нить. Часто в процессе размножения участвуют гормогонии - кусочки нити, которые разрастаются в новую особь. Этот процесс аналогичен вегетативному размножению высших растений. Типичного полового процесса у цианобактерий нет, но процессы, сходные с трансдукцией, отмечали многие исследователи.

Перед клеточным делением количество ДНК удваивается, а по мере деления клетки удвоенное количество ДНК разделяется пополам. Клетки цианобактерий делятся таким образом, что на боковой стенке их возникает кольцевая складка,

образованная цитоплазматической мембраной и внутренними (L_1 и L_2) слоями клеточной оболочки. Разрастаясь в центростремительном направлении, эта складка смыкается наподобие ирисовой диафрагмы микроскопа, формируя поперечную перегородку — септу, перерезающую тилакоиды и содержимое клетки.

В середине поперечно перерезанной септы в процессе утолщения муреинового слоя сравнительно рано становится различимым слой более низкой плотности — срединная ламелла. У одноклеточных форм и многих ностокальных, у которых образование клеточной перегородки сопровождается появлением более или менее глубокой перетяжки между дочерними клетками, клетки разъединяются путем центрипетального врастания в плоскость срединной ламеллы между слоями муреина (L_2) наружных (L_3 и L_4) слоев клеточной оболочки. Таким образом, у многих ностокальных разрыв трихома при образовании гормогониев происходит между клетками — интерцеллюлярно.

Совсем иначе разъединяются клетки у многих осцилляторийных и сцитонемовых. Хотя муреиновые слои зрелой септы разъединены срединной ламеллой, расщепления септы и расхождения клеток в этой области не происходит, так как муреиновые слои закреплены у периферического утолщения края диска септы. Слабым местом в муреиновом одеянии клеток у форм с нерасщепляющейся септой является набор многочисленных мелких *соединительных пор*, расположенных по окружности по обе стороны от септы — вдоль соединения ее с продольными стенками. Разрыв трихомов при образовании гормогониев происходит вдоль соединительных пор — поперек клеток — трансцеллюлярно и связан с гибелью клетки, «приносимой в жертву» — «жертвенной клетки». При этом ненарушенные септы между «жертвенной клеткой» и двумя соседними с ней клетками становятся стенками конечных клеток сформировавшихся гормогониев. Остатки клеточных стенок «жертвенных клеток» могут служить доказательством того, что разрыв произошел не благодаря расщеплению септ между живыми клетками, а трансцеллюлярно. Такие остатки оболочек отмерших клеток, по которым происходит разрыв, часто можно видеть в оптическом микроскопе на концах трихомов осцилляторий. Как интерцеллюлярным, так и трансцеллюлярным разрывам способствуют многократные изгибы трихомов.

У одних нитчатых цианобактерий все клетки нити одинаковы — это *гомоцитные талломы*; у других нити состоят из вегетативных клеток и гетероцист, нередко наблюдаются и споры (акинеты) — *гетероцистные формы*. Гетероцисты и споры — это специализированные клетки, образующиеся путем дифференцировки вегетативных клеток. Один из наиболее заметных признаков гетероцист (даже при наблюдении в оптическом микроскопе) - их сильно утолщенные стенки. Клеточные стенки гетероцист, как и вегетативных клеток, состоят из слоев L₁- L₄, но снаружи от них развиваются еще три специальных слоя оболочки гетероцист. Непосредственно снаружи от клеточной стенки располагается пластинчатый слой, особенно толстый у глубокой перетяжки между гетероцистой и соседней вегетативной клеткой, где имеется поровый канал «пора», пересеченная септой, пронизанной микроплазмодесмами, посредством которых сообщаются гетероциста и вегетативная клетка. Снаружи от пластинчатого слоя находился гомогенный слой, который без резкой границы переходит в самый наружный фибриллярный слой. Благодаря толстой обертке, образующейся снаружи от клеточной оболочки, гетероцисты выдерживают механические воздействия, разрушающие более тонкостенные вегетативные клетки.

Другой (помимо толстых оболочек) признак зрелых гетероцист, легко наблюдаемый в оптический микроскоп, - гомогенность клеточного содержимого, которая обусловлена исчезновением гранулярных включений, характерных для вегетативных клеток. Ни волютина, ни цианофициновых зерен в полностью развитых гетероцистах нет. Единственные гранулярные структуры, которые можно различить на электронных микрофотографиях зрелых гетероцист, - рибосомы. Газовые вакуоли, если они были в вегетативных клетках, при дифференцировке их в гетероцисты также исчезают.

Наконец, дифференцировка гетероцист сопровождается реорганизацией мембранной системы клетки: тилакоиды разрушаются и формируются новые плотно упакованные мембраны. Преобразование мембранной системы сопряжено с изменениями в пигментном составе: в гетероцистах обнаруживаются хлорофилл и каротиноиды, но почти нет фикоцианина, аллофикоцианина и фикоэритрина.

Фибриллы ДНК, в вегетативных клетках обычно сконцентрированные в нуклеоплазме (центроплазме), в гетероцистах рассеяны по всей цитоплазме

В многочисленных исследованиях было показано, что образование гетероцист, как и процесс фиксации атмосферного азота, ингибируется присутствием в питательной среде связанного азота, особенно аммонийного. Исходя из этих данных стало возможным при выращивании на средах, содержащих связанный, особенно аммонийный азот, искусственно получать *трихомы* (нити) без гетероцист у родов, в норме характеризующихся наличием гетероцист, например у анабенов, ностоков и др. При перенесении такого безгетероцистного материала в среду, свободную от связанного азота, можно проследить все стадии развития гетероцист из вегетативных клеток. Дифференцировка гетероцист начинается с образования самого наружного фиброзного слоя ее оболочки снаружки от клеточной стенки дифференцирующейся вегетативной клетки. Образование фиброзного слоя и следующего гомогенного слоя сопровождается разрушением гранулярных цитоплазматических включений и тилакоидов. На конечной стадии развития гетероцист откладывается самый внутренний пластинчатый слой оболочки гетероцисты, особенно толстый вокруг порового канала, и формируется развитая мембранная система, по-видимому, путем соединения мелких пузырьков, возникающих на местах предшествующих тилакоидов.

Давно известно, что у таких родов, как анабена, носток, характеризующихся интеркалярными гетероцистами, в гетероцисты превращаются не любые вегетативные клетки, а лишь некоторые, расположенные на определенном расстоянии друг от друга. Сравнительно недавно было высказано предположение, что гетероцисты анабены выделяют ингибитор, подавляющий дифференцировку вегетативных клеток в гетероцисты. Последние возникают из вегетативных клеток, расположенных вне ингибирующих зон, окружающих ранее образовавшиеся гетероцисты.

У очень многих гетероцистных форм, в зрелом состоянии характеризующихся интеркалярными гетероцистами, их молодые проростки имеют терминальные гетероцисты.

Относительно функции гетероцист высказывались разные предположения. У гетероцистных форм распад нитей на отдельные участки (гормогонии), из которых развиваются новые талломы, обычно происходит по гетероцистам, соответственно, им приписывалась и известная роль в вегетативном размножении. Наблюдаемые

иногда случаи деления содержимого гетероцист позволяли предположить их первоначальную (впоследствии утраченную) роль в качестве клеток, предназначенных для размножения. Было высказано предположение, что исчезновение гетероцист, наблюдаемое на средах, в состав которых входит связанный азот, объясняется как раз их прорастанием. Однако в естественных условиях прорастание гетероцист редкое явление. Против их роли в качестве клеток бесполого размножения свидетельствует не только то, что они лишены запасных продуктов, которые могли бы поддерживать начальные стадии прорастания, но и то, что при отделении их от нити, они, как правило, быстро разрушаются, возможно, оттого, что в отличие от спор не защищены со всех сторон оболочкой. Согласно последним данным в гетероцистах происходит фиксация атмосферного азота в аэробных условиях.

Другими специализированными клетками, которые также образуются путем дифференцировки вегетативных клеток, являются споры – акинеты. Это обычно более крупные, чем вегетативные, клетки, толстостенные, причем споровый покров окружает акинету полностью в отличие от гетероцист, которые через поровый канал сохраняют контакт с соседними вегетативными клетками. При дифференцировке спор из вегетативных клеток заметно утолщается L_2 (муреиновый) слой и, кроме того, снаружи от клеточной оболочки образуется широкая обертка. В отличие от гетероцист зрелые споры переполнены запасными гранулярными включениями, особенно цианофициновыми зернами. Расположение и структура тилакоидов в спорах те же, что и в вегетативных клетках. Содержание ДНК в спорах заметно возрастает, иногда в 20—30 раз по сравнению с содержанием ее в вегетативных клетках. Как и в случае гетероцист, вегетативные клетки, превращающиеся в споры, утрачивают газовые вакуоли.

Спорообразование у цианобактерий стимулируется разными факторами среды, но особенно фосфором. Споры могут выдерживать высыхание и другие неблагоприятные условия. Они могут прорасти сразу же после образования, без какого-либо периода покоя, при помещении в благоприятные условия. При отсутствии таких условий споры долго сохраняют жизнеспособность. При прорастании споры образует один проросток, освобождающийся через разрыв оболочки.

Большинство одноклеточных и колониальных цианобактерий размножаются посредством деления клеток пополам, у некоторых посредством мелких клеток

«гонидий», образующихся или внутри материнской клетки (*эндоспор*), или отшнуровывающихся от верхушки материнской клетки (*экзоспор*). Подавляющее большинство нитчатых цианобактерий размножается посредством гормогониев - участков, на которые распадаются нити.

Распространенность цианобактерий в природе. Экологическая роль цианобактерий

Цианобактерии имеют широкое распространение в воздушных, водных и почвенных экотопах. Они могут заселять также самые разнообразные искусственные и естественные субстраты, начиная с различных памятников, атомных реакторов и водных магистральных сооружений, шерсти белых медведей, надкрыльев жуков. Цианобактерии обладают повышенной адаптивной устойчивостью к экстремальным условиям: перенесению полярных температур от льдов Антарктиды и песков жарких пустынь; существование на засоленных маршах и в пресных водоемах; ацидо- и алкалотолерантность. После трагических событий на Чернобыльской АЭС выяснилось, что меньше всего пострадали цианобактерии, которые были способны без ущерба вынести радиацию, накапливать в себе радионуклиды, стронций и кобальт в размерах, значительно превышающих их содержание в окружающей среде.

Цианобактерии приспособлялись в процессе эволюции к изменяющимся условиям (перепады температур, отсутствие озонового экрана, действие жесткого излучения и т.д.), расширяя адаптационные возможности и в то же время сохраняя свои физиолого-биохимические свойства. Это обеспечивало легкий переход с одного типа метаболизма на другой при изменении условий среды. Поражает, с одной стороны, их наличие в древних строматолитах и, с другой, – процветание этой группы микроорганизмов в настоящее время.

Инвентаризация цианобактерий, проведенная на кафедре ботаники, физиологии растений и микробиологии ВГСХА учениками школы профессора Штиной, показала, что в почвах на территории бывшего СССР обнаружено 429 видов этих организмов, главным образом, порядки *Chroococcales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*. Порядок *Nostocales* широко представлен в самых разнообразных почвах. Наиболее часто встречаются представители родов *Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*. Основная масса клеток сосредоточена в поверхностных слоях почвы. В периоды их интенсивного

размножения, так называемого «цветения» почвы, численность клеток может достигать от десятков тысяч до миллионов на см² поверхности почвы. Это вызывает изменение окраски почвы от естественной до оливково-зеленой и темно-зеленой.

Имеются материалы, свидетельствующие о том, что цианобактерии могут проникать вглубь почвы и занимать место ризосферной микрофлоры. Это явление может быть связано с механическим затаскиванием цианобактерий с корнями растений или с промывными водами. Возможно, глубинные формы обеспечивают сохранение пула цианобактерий в почве. Тип их питания в глубине мало изучен, но доказана способность ряда штаммов к гетеротрофии и миксотрофии. Преимущественно цианобактерии – базофильные организмы, но некоторые виды достаточно ацидотолерантны, о чем свидетельствуют их массовые разрастания на кислых почвах нечерноземной зоны. Они достаточно холодоустойчивы, и их популяции не погибают после первых заморозков. По-видимому, большинство цианобактерий – убиквисты, т.е. один и тот же вид может быть найден в различных климатических условиях. В частности, это относится к видам порядка *Nostocales*. Но соотношения разных видов в почвенных альгоценозах может зависеть от почвенно-географических условий. При продвижении к югу по почвенно-растительным зонам в азотфиксирующем комплексе ЦБ увеличивается роль видов *Nostoc* и *Calothrix*, снижается присутствие *Cylindrospermum*. Виды р. *Anabaena* обычно в аридных и экстраридных областях играют меньшую роль, чем в гумидных.

Цианобактерии широко распространены в почвенных биоценозах. Они принимают участие во многих биохимических процессах, в накоплении органических веществ и азота, разрушении минеральных субстратов, распределении и аккумуляции различных элементов. В процессе жизнедеятельности цианобактерии обуславливают изменения среды, ведущие к формированию почвы. Они часто образуют различного вида разрастания на поверхности почвы. Изучение этих явлений позволило установить, что эти организмы обычно не ограничиваются поверхностью почвы, а в той или иной степени входят вглубь. Наблюдается проникновение некоторых видов до 3 мм вглубь песка. Это дает основание считать их первыми гумусообразователями.

Видовой состав цианобактерий, обитающих в почвах, довольно разнообразен. В почве обнаружены главным образом представители порядков *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, среди них широко распространены представители родов *Nostoc*,

Anabaena и Cyllindrospermum. Виды Nostoc и Anabaena способны массово развиваться на поверхности почвы, вызывая «цветение». Представители порядка Oscillatoriales также широко распространены в почве, особенно виды родов Oscillatoria, Phormidium и Lyngbya. Виды Cyllindrospermum часто образуют характерные темные слизистые пятна на поверхности глинистой и суглинистой почв.

Интенсивность размножения цианобактерий на поверхности почвы зависит от многих факторов: влажность почвы и воздуха, температура почвы и воздуха, тип почвы, солевой состав почвы, наземная растительность, способ обработки почвы, применяемые удобрения, освещенность. Поэтому численность клеток в пленках «цветения» колеблется в широком интервале. Летом в составе таких пленок цианобактерии составляют около 17 %, помимо них там содержатся почвенные водоросли.

Отмечены следующие физиологические и экологические особенности цианобактерий, обуславливающие способность существования во вневодной среде и определяющие их участие в формировании почв.

1) Способность протопласта выдерживать длительное высушивание и многократно переходить из состояния покоя к активной вегетации и наоборот. Наземные корочки или на скальные налеты цианобактерий, высыхающие в сухие периоды, при увлажнении «оживают», начиная расти уже через несколько часов, и таким путем используют кратковременное увлажнение для активного роста. Цианобактерии не требуют промачивания почвы и нуждаются лишь в высокой влажности воздуха. Для быстрого поглощения и удержания воды большое значение имеют слизистые влагища.

2) Устойчивость к высоким температурам, которые создаются на открытой поверхности, и к сильной инсоляции, в том числе ультрафиолетовой. Цианобактерии выделяются также высокой стойкостью к ультрафиолетовым лучам.

3) Лабильность углеродного питания. Благодаря способности к миксотрофному питанию, цианобактерии при переходе на питание органическими веществами могут жить в темноте.

4) Способность к усвоению атмосферного азота. Цианобактерии — единственная группа организмов, сочетающих в одном организме фотосинтез и азотфиксацию. Азотфиксация доказана для более чем 30 видов цианобактерий. Все

они, за исключением *Mastigocladus laminosus*, относятся к порядку Nostocales.

Поскольку среди азотфиксаторов преобладают виды, приуроченные к вневодным местообитаниям или к условиям неустойчивой влажности, встречающимся, например, на рисовых полях, можно рассматривать азотфиксацию как одно из приспособлений, связанных с жизнью на суше.

5) Приспособления к симбиозу и образованию сообществ. Помимо известных явлений симбиоза цианобактерий с грибами в составе лишайников и с высшими растениями (папоротник *Azolla*) у наземных цианобактерий нередко образуются сообщества с водорослями или с бактериями; симбиотические отношения между членами сообщества облегчают существование в суровых условиях среды.

На поверхности пустынных почв наблюдали совместное образование слоевища двумя видами цианобактерий: один из них — тенелюбивый (*Schizothrix atacamensis*) — образует нижний слой и, выполняя роль фитиля, снабжает влагой верхний слой, составленный светолюбивым видом *Calothrix desertica*. «Ностокосцитонемовый ценоз», образующий сине-зеленые корочки в сухих степях и полупустынях, включает в свой состав огромное количество диатомей, которые находят в слизистых обертках цианобактерий защиту от высыхания и инсоляции. Известен симбиоз цианобактерий с азотфиксирующими и олигонитрофильными бактериями, благодаря которому даже не способные к азотфиксации виды цианобактерий отличаются высоким содержанием азота в клетках — 7—8 % от сухого веса.

6) Обитание в зоне корней — ризосфере. В почвах, заселенных травянистыми растениями, цианобактерии, подобно другим почвенным микроорганизмам, накапливаются в ризосфере; при этом они используют некоторые корневые выделения и, прикрепленные к корням, продвигаются в более глубокие слои почвы.

Жизнедеятельность цианобактерий обуславливает изменения среды, ведущие к формированию почвы и ее плодородия.

С деятельностью цианобактерий в почве связаны следующие процессы:

1) Накопление органического вещества. Эта роль цианобактерий наиболее заметна на начальных этапах почвообразования — на выветривающихся скальных породах, на голых субстратах в тундре.

2) Накопление азота. Азотфиксирующие виды цианобактерий широко распространены в почвах и особенно в рисовых полях, где они обеспечивают

получение урожая без внесения азота.

Цианобактерии способствуют обогащению воды кислородом, очищают ее в тех водоемах, которые загрязнены органическими веществами.

Цианобактерии наряду с другими микроорганизмами способны синтезировать витамины и участвовать в снабжении высших растений этими соединениями. При введении в растение тиамин, никотиновой кислоты и др. повышается интенсивность фотосинтеза и увеличивается содержание сахаров. Усиливая превращение продуктов фотосинтеза, эти витамины создают благоприятные условия для большей интенсивности усвоения углекислого газа растением. Цианобактерии водоемов, синтезируя разнообразные органические вещества, оказывают существенное влияние на жизнедеятельность обитающих там организмов.

Изучалось участие цианобактерий в деградации нефти. Исследования показали, что выделенные цианобактериальные сообщества (ЦБС) оказались способными не только адаптироваться к нефти и нефтепродуктам, но и активизировать процессы очистки от нефтяных углеводородов. Наиболее интенсивно процесс деструкции отмечен с внесением биомассы ЦБС на основе *Phormidium tenuissimum*, *Synechocystis minuseula* и *Synechococcus elongates*. Установлено, что при внесении ЦБС в шлам создаются условия для формирования активного биоценоза бактерий, грибов и водорослей, что способствует более полному процессу биodeградации нефтяных углеводородов. Это позволяет рассматривать ЦБС как перспективные объекты экологической биотехнологии для разработки новых способов и приемов биоремедиации нефтезагрязненных водных и почвенных объектов.

Цианобактерии широко распространены в разнообразных водных и вневодных биотопах, бывают одноклеточными или многоклеточными (колониальные или нитчатые). Они могут быть прикрепленными и неприкрепленными к субстрату, неподвижными или способными к скользящему движению, однако жгутиков или ресничек никогда не образуют. Обитают цианобактерии преимущественно в водоемах, богатых органическим веществом. Среди них есть планктонные и бентосные формы. Широко известными представителями цианобактерий являются осциллятория (*Oscillatoria*) и носток (*Nostoc*) - обитатели пресных водоемов. Гетероцисты и споры у них не образуются. Носток - колониальная форма, представляющая собой слизистые скопления извилистых нитей, состоящих из

шаровидных клеток; хорошо заметны желтые гетероцисты.

Некоторые цианобактерии синтезируют сидерофоры - вещества, связывающие ионы железа и делающие их доступными для бактерии. Другие, развивающиеся в прибрежной зоне водоемов, синтезируют сурфактанты - поверхностно-активные соединения. При волнении вода у берега становится мутной за счет взвешенных частиц песка и детрита. В присутствии сурфактанта частички слипаются и оседают на дно, вода становится прозрачной и цианобактерии получают достаточно света. Многие цианобактерии синтезируют биологически активные вещества. Это могут быть антибиотики с гербицидной активностью, препятствующие росту других цианобактерий, водорослей и высших растений (рис. 3). Значение способности к синтезу таких веществ при конкуренции в природе очевидна. Было бы крайне желательно производство таких гербицидов промышленностью, поскольку они экологически безопасны и не токсичны для человека и животных. Реже цианобактерии образуют антибиотики, активные против грибов и гетеротрофных бактерий (рис. 4). Приспособительное значение таких антибиотиков менее очевидно, но следует отметить, что существуют грибки и бактерии, паразитирующие на цианобактериях.

К сожалению, довольно многочисленные цианобактерии образуют токсины, губительные для животных и человека. Это представители родов *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* и др. Способность к образованию яда не видовой признак, а свойство штамма или клона, то есть здесь наблюдаются внутривидовые различия. Яды образуют главным образом планктонные формы. Токсины бывают двух типов - нейротоксины или гепатотоксины. Первые представляют собой алкалоиды, действующие на нервную систему. Цианобактерии, образующие нейротоксины, встречаются относительно редко. Гепатотоксины - это циклические гепто- или пентапептиды (то есть короткие цепи белковой природы, составленные пятью или шестью аминокислотами), содержащие необычные аминокислоты. К настоящему времени описано множество разновидностей таких пептидов, различающихся структурой и степенью токсичности. Гепатотоксин, попавший в организм животного, вызывает разрушение печени, и через несколько часов наступает смерть. Низкие дозы яда вызывают развитие рака. Случаи гибели людей от гепатотоксинов цианобактерий в литературе не описаны, но представляется

совершенно очевидным, что некоторые люди, умершие от рака печени, убиты цианобактериями. Токсины находятся в клетках цианобактерий и только после их разрушения выходят в воду. Они весьма устойчивы и не разрушаются при хлорировании воды, токсины сохраняются и в сухих клетках. Если вы вынуждены иметь дело с водой, содержащей взвесь цианобактерий, лучше не контактировать с такой водой, особенно нужно избегать попадания воды в глаза. Для питья необходимо использовать только отфильтрованную и тщательно прокипяченную воду. При кипячении яды разрушаются.

Среди цианобактерий есть формы, способные к участию в симбиотических ассоциациях. Около 8% лишайников содержат в качестве фикобионта цианобактерии, которые могут иметь различное систематическое положение. Цианобактерии поставляют грибу, входящему в состав лишайника, продукты фотосинтеза и, если это азотфиксирующие формы, - соединения связанного азота, так что смысл ассоциации для гриба понятен. Какую пользу извлекают из симбиоза цианобактерии, непонятно.

Азотфиксирующие представители родов *Nostoc* и *Anabaena* могут быть симбионтами некоторых мхов, имеющих на листьях наполненные слизью полости, в которые цианобактерии проникают и там поселяются. Известен единственный случай симбиоза цианобактерий с папоротником - это тропический папоротник *Azolla* и цианобактерия *Anabaena*, которая поселяется в специальных полостях на листьях папоротника и за счет азотфиксации может обеспечить азотом как свое развитие, так и рост папоротника. Цианобактерии из родов *Nostoc* или *Anabaena* образуют клубеньки на корнях некоторых цикадовых, причем клубеньки образуются только около поверхности земли, так что цианобактерии могут осуществлять фотосинтез. *Nostoc* образует клубеньки на листьях или стеблях некоторых видов *Gunnera* - покрытосеменного растения, обитающего в южном полушарии. В данном случае развитие цианобактерий происходит внутри клеток растения-хозяина. В морской среде известны случаи симбиоза цианобактерий и губок или асцидий. Цианобактерии живут внутри клеток некоторых водорослей и жгутиконосцев. В этом случае симбиоз может быть облигатным, то есть обязательным, цианобактерии уже не могут жить самостоятельно, и тогда их называют цианеллами. Цианелла - это нечто среднее между цианобактерией и клеточной органеллой. В эволюции биосферы способность цианобактерий к симбиозу имела чрезвычайно большое значение.

Как принято считать, прокариоты, в том числе и цианобактерии, появились на Земле в самом начале существования биосферы. Никто не знает, от кого произошли бактерии, поэтому создаются разные мифы, например, что бактерии занесены на Землю разумными существами для эксперимента, или что бактерии разносятся кометами и т.п. Но большинство ученых считают, что бактерии произошли от более примитивных организмов, природа которых пока неизвестна. Большое значение для формирования наших представлений об эволюции жизни на Земле имели успехи палеомикробиологии, развитие которой началось в 50-е годы нашего столетия. Давно было известно, что в осадочных породах можно обнаружить окаменевшие остатки древних растений и животных, однако клетки прокариот даже если там и присутствуют, достоверно не могут быть идентифицированы. Это действительно справедливо для известняков, песчаников, каменного угля и т.п. Но оказалось, что мумифицированные клетки прокариот можно обнаружить в теле осадочной породы кремня. Для этого нужно изготовить очень тонкую и потому прозрачную пластинку кремня, что не представляет особых затруднений. При микроскопировании таких пластинок можно обнаружить колонии и нити, совершенно идентичные колониям и нитям современных цианобактерий. Остатки цианобактерий обнаружены в кремнях, взятых на разных континентах и имеющих разный возраст. Наиболее древними были кремни из Австралии, возраст которых около 3500 миллионов лет, более древние осадочные породы просто не были найдены. В этих кремнях присутствуют 7 различных морфологических типов (видов) прокариот, то есть уже тогда существовали разнообразные, с довольно сложной морфологией прокариоты, похожие на цианобактерии. Ископаемые цианобактерии найдены и в кремнях, взятых на Урале и в других районах страны. Присутствие цианобактерий в древнейших отложениях само по себе удивительно, но это еще означает, что в то время в земной атмосфере уже присутствовал кислород. Существование цианобактерий в докембрии подтверждается и другого типа ископаемыми. Это строматолиты. В наше время строматолиты образуют сообщества нитчатых цианобактерий, развивающиеся в толстых пленках - матах в условиях солоноводных мелководий, например на побережье Австралии. На пленке постепенно нарастает слой кальцита, нити бактерий отмирают или переползают вверх. Постепенно образуется слоистая структура - строматолит. Строматолиты имеют характерное строение и форму, иногда кальцит

здесь замещается кремнем. Подобные строматолиты обнаруживают и в докембрийских отложениях. То, что цианобактерии образовывали кислород уже в самые начальные периоды развития жизни на Земле, представляется спорным. Не подлежит, однако, сомнению, что именно деятельность цианобактерий постепенно обеспечила формирование кислородной атмосферы, в условиях которой стало возможным возникновение растений и животных. Считают, что прокариоты появились на Земле 3 - 4 млрд. лет тому назад, тогда как эукариоты, по разным расчетам, только 2,5 - 1,5 млрд. лет тому назад. Приблизительно к этому времени (1,2 - 1,4 млрд. лет тому назад) за счет деятельности цианобактерий содержание кислорода в атмосфере достигло примерно 0,2% (в современной атмосфере 21%). В дальнейшем кислород накапливался за счет активности не только цианобактерий, но и появившихся к этому времени растений; около 440 млн. лет тому назад в нижнем силуре в атмосфере было уже около 2% кислорода, что определило вспышку эволюции аэробных эукариот. Роль цианобактерий, однако, не исчерпывается их влиянием на состав атмосферы, они явились предшественниками хлоропластов растений. Данные молекулярной биологии с несомненностью свидетельствуют о том, что при возникновении эукариотической клетки большое значение имело превращение симбиотических прокариот в клеточные органеллы. Получено много доказательств того, что хлоропласты растительных клеток образовались из симбионтов - древних цианобактерий. Таким образом, в процессе эволюции биосферы цианобактерии не только создали условия, необходимые для возникновения и жизни эукариот - кислородную атмосферу, но также явились предками хлоропластов растений, а без растений не возникли бы и животные, в том числе и человек. Поэтому утверждение об исключительности цианобактерий как группы живых организмов, высказанное в начале статьи, представляется вполне оправданным.

Устойчивость цианобактерий к загрязнениям и механизмы адаптации к ним

Толерантность бактерий к различным условиям среды обитания, основанная на широком спектре механизмов бактериальной адаптации, служит и служила залогом поразительной устойчивости прокариотной экосистемы, но с другой стороны, и причиной ее консервативности.

К числу приоритетных загрязнителей биосферы относятся нефть, нефтепродукты, соли тяжелых металлов. Механизмы трансформации данных веществ различны у разных микроорганизмов и могут быть обусловлены морфологическими и физиологическими особенностями.

Антропогенное загрязнение окружающей среды нефтепродуктами является важной экологической проблемой. Поэтому способы удаления этих веществ из окружающей среды, являются предметом изучения многих отраслей науки, и в первую очередь микробиологии.

Классические методы очистки вод и почв, такие как экстракция, растворителями, адсорбция и химическое окисление являются очень дорогими и при этом могут образоваться опасные продукты. Биологические методы очистки (биоремедиация) в этом отношении более предпочтительны.

Изучению нефтеразрушающих микробных консорциумов бактерий и цианобактерии в последнее время начали уделять большее внимание, в то время как консорциумы бактерий и водорослей остаются до сих пор почти не исследованными.

Биоремедиация загрязненных нефтью экосистем ассоциациями микроорганизмов - нефтедеструкторов и устойчивых к загрязнению водорослей и цианобактерии позволит интенсифицировать процесс очистки. Кроме того, если эти организмы будут сами способны к разрушению ксенобиотиков, то внесут дополнительный вклад в биоремедиацию техногенных экосистем.

Среди особых загрязнителей особое место занимают тяжелые металлы. Механизм токсического действия тяжелых металлов зависит от природы соединения и изучаемого организма. В основном он заключается в связывании с определенными функциональными группами, что приводит к инактивации ферментов. Дополнительные механизмы токсического действия тяжелых металлов связаны с тем, что последние могут играть роль антиметаболитов, то есть образовывать хелаты с важными метаболитами или катализировать их распад, а так же замещать структурно или электрохимически важные элементы, что приводит к нарушению ферментативной или клеточной функции.

К группе тяжелых металлов относят более 40 химических элементов периодической системы Д.И.Менделеева с атомными массами свыше 50 а.е.м..

Тяжелые металлы являются протоплазматическими ядами, токсичность которых увеличивается по мере увеличения атомной массы. Токсичность тяжелых металлов проявляется по-разному. В целом основа токсического действия лежит во взаимодействии между металлом и биологически активными белками.

В природе токсичное действие металлов нередко с трудом поддается объяснению будучи результатом сложных взаимоотношений с другими минеральными элементами. Эту картину еще более усложняют факторы окружающей среды: температура, влажность, интенсивность освещения и т.д., которые могут видоизменять, ослаблять или усиливать реакцию водорослей на токсичное действие металлов. Приспособление организмов к избытку химических элементов происходит тоже не одинаково.

В круге организмов-биоремедиаторов цианобактерии обладают многообразием путей обезвреживания поллютантов.

В первую очередь, адаптация цианобактерий к неблагоприятным внешним воздействиям обусловлена интенсивным выделением внеклеточной слизи. Доля этих веществ в общем балансе клетки весьма существенна и составляет примерно 30% связываемого за сутки углерода или 40% чистой суточной продукции фотосинтеза.

Экссудация слизи приводит к проявлению у цианобактерий сорбционных способностей, способствующей внеклеточной детоксикации поллютантов. Чем большее количество слизи выделяется, тем полнее связываются поллютанты из раствора. Связывание тяжелых металлов осуществляется как полисахаридами, так и липофильной фракцией клеток. Более того, возможна дистанционная детоксикация, при которой система защиты цианобактерий от тяжелых металлов включает связывание металла не только клеточными структурами, слизистой оболочкой, но и экзополисахаридами в культуральной среде. Различные цианобактерии обладают разной сорбционной способностью. Так, обнаружено, что поглощение свинца из жидкой среды составляет у *N. paludosum* около 80%, у *N. muscorum* – 91,3% от изначальной концентрации. Сорбционная ёмкость различных штаммов цианобактерий р. *Phormidium* колебалась (в мг металла/г сорбента) от 5 до 150 для меди, от 5 до 400 для свинца, от 5 до 340 для урана. При этом биомасса цианобактерий может многократно использоваться в циклах сорбции-десорбции

металла без снижения эффективности его удаления, что уже применяется в специальных установках по очистке сточных вод.

Существуют и другие адаптационные механизмы, позволяющие цианобактериям выживать в условиях сильного загрязнения. В частности, экспериментально доказано, что внутри клетки большую роль в связывании ионов тяжелых металлов имеет глутатион и ферменты глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, поддерживающие его окислительно-восстановительное состояние. Предполагают, что глутатионовая система может служить первой линией обороны в системе защиты клеток в период, предшествующий формированию такого важного инструмента защиты, как металлсвязывающие белки. Образование внутри клеток нерастворимых сульфидов – также один из способов детоксикации, обнаруженный у *Nostoc muscorum* и *Plectonema boryanum*. У ряда цианобактерий в загрязнённых средах наблюдается увеличение числа гранул гликогена и образование полифосфатных гранул, которые захватывают ионы тяжелых металлов, находящиеся в избытке.

В детоксикации поллютантов важную роль играют гетеротрофные спутники цианобактерий, биомасса которых в зависимости от фазы роста фототрофного партнёра составляет 3,36-12,26% по отношению к биомассе цианопрокариот, а также фототрофные партнёры в случаях использования в ремедиационных целях альго-цианобактериальных микробных сообществ.

Таким образом, краткий обзор экологических возможностей цианобактерий показывает, что эти организмы в виде монокультур, искусственно сконструированных циано-бактериальных консорциумов или природных биоплёнок являются перспективными объектами для разработки новых методов и приёмов реабилитации почв, фитотоксичных вследствие химического загрязнения.

Использование цианобактерий в составе биопрепаратов

Цианобактерии в процессе жизнедеятельности синтезируют и выделяют в окружающую среду органические вещества различной химической природы и биологической активности.

Среди экзогенных метаболитов цианобактерий наиболее изучены азотсодержащие соединения, которые играют важную роль в круговороте азота. Эти организмы выделяют аминокислоты: лейцин, фенилаланин, валин, метионин,

тирозин, пролин, аланин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты, треонин, серин, глицин, аргинин, гистидин, лизин, цистин, а также пептиды и полипептиды. Наряду с азотсодержащими соединениями цианобактерии выделяют в среду ряд органических кислот: щавелевую, янтарную, яблочную, лимонную, муравьиную, уксусную, пеларгоновую и масляную.

У некоторых цианобактерий выделены и идентифицированы вещества углеводной природы, в частности, полисахариды, которые состоят, в основном, из глюкозы, фруктозы, арабинозы, ксилозы, рибозы, раминозы и глюкуроновой кислоты.

Большое экологическое значение имеют летучие вещества цианобактерий, эфирные масла, обладающие высокой биологической активностью. В многокомпонентной системе летучих соединений идентифицированы производные алифатических терпенов, терпеновые спирты, эфиры, альдегиды, летучие кислоты и фенолы.

Цианобактерии являются важным источником витаминов в водоемах и других биоценозах. Они синтезируют витамины группы В и ауксиноподобные вещества. Многие цианобактерии образуют токсины, а также антибиотические вещества.

Впервые сообщение о токсическом действии цианобактерий, вызывающих «цветение» воды, появилось более 100 лет назад. Было замечено, что с «цветением» водоемов, обусловленным массовым развитием цианобактерий, всегда совпадают случаи массовой гибели рыб, животных, водоплавающих птиц, отравления человека. Было установлено, что токсины цианобактерий могут накапливаться в тканях рыб и быть причиной их заболевания и гибели.

В пределах одного и того же вида цианобактерий существуют штаммы, неодинаковые по токсичности. Способность отдельных культур образовывать токсические вещества проявляется в определенном состоянии или при соответствующих условиях окружающей среды. Степень токсичности зависит от биологических особенностей и физиологического состояния вида – продуцента. Замечено, что цианобактерии наиболее токсичны при массовом развитии в особенно теплые и засушливые годы с высокой температурой воды, низким ее уровнем и большим запасом питательных веществ. Установлено, что степень токсичности цианобактерий изменяется в процессе роста культуры и зависит от возраста и плотности популяции. Сопутствующая микрофлора может стимулировать, либо

угнетать процесс токсинообразования, но образование токсичных метаболитов осуществляется непосредственно цианобактериями.

Некоторые цианобактерии способны оказывать ингибирующее действие и на растения, выделяя губительные для последних эфирные масла.

Перед утилизацией больших масс цианобактерий из «цветущих» водохранилищ для удобрительных целей, существует необходимость их детоксикации, так как они могут оказать фитотоксическое действие.

Считают, что «цветение» воды вызывается примерно 20 широко распространенными видами цианобактерий, хотя токсическая активность установлена у представителей 7 родов пресноводных и 2 родов морских цианобактерий. Сравнительно полная информация по токсичности получена для *Microcystis aeruginosa* - основного возбудителя «цветения» пресноводных водоемов. Слабую способность к токсинообразованию проявляли лабораторные штаммы *Anabaena hassalii*, *A. variabilis*, *Calothrix* sp., *Nostoc paludosum*.

Сведения о токсических метаболитах водорослей достаточно обширны, однако химическая идентификация большинства соединений не проведена, что затрудняет установление основных закономерностей их проявления и трансформации [8], известно лишь, что большинство из них является циклическими пептидами и полипептидами.

Токсины и фитотоксины, продуцируемые различными видами цианобактерий, имеют большое экологическое и токсикологическое значение. Фитотоксины, обладающие высокой биологической активностью и специфичностью действия, представляют интерес в связи с перспективой использования их как гербицидов микробного происхождения.

В отличие от водных форм среди почвенных цианобактерий значительно меньше фитотоксических штаммов, что позволяет видеть перспективы их использования для повышения продуктивности сельскохозяйственных растений.

В полевых условиях роль цианобактерий в накоплении азота может быть не только прямой, но и косвенной. Они усиливают общую микробиологическую активность почвы. Поскольку в слизи цианобактерий часто обитают бактерии — фиксаторы азота, первые являются основой природных азотфиксирующих

комплексов. Выделяя в окружающую среду разнообразные вещества, водоросли могут действовать на другие организмы почвы и как активаторы, и как ингибиторы.

3) Действие на минеральную часть почвы или породы. Известна способность цианобактерий разрушать первичные минералы и участвовать в выветривании горных пород. Избирательно поглощая отдельные элементы, многие цианобактерии концентрируют их в золе и становятся фактором перераспределения их в почвенных слоях. Одной из форм связывания элементов является хелатизация — образование внутрикомплексных соединений металлов с некоторыми органическими веществами цианобактерий.

4) Влияние на физические свойства почвы. В некоторых случаях, особенно при образовании пленок, водоросли изменяют водно-физические свойства почвы. Корочки цианобактерий на поверхности пустынных почв уменьшают эрозию, улучшают просачивание воды и способствуют укреплению ростков. Рост цианобактерий повышает водоудерживающую способность почвы на 40%.

Интенсивное применение химических препаратов в земледелии, наряду с повышением продуктивности почвы, неизбежно вызывает ряд нежелательных явлений: ухудшение свойств почвы, загрязнение окружающей среды, снижение качества сельскохозяйственной продукции в связи с накоплением в ней вредных для организма человека веществ. Поэтому привлекательна идея использования альтернативных препаратов, в которых действующим началом являются микроорганизмы. Цианобактерии являются очень перспективными в этом отношении.

Внесение цианобактерий в почву экологически безопасно, так как цианобактерии — постоянный, биологически значимый компонент любой почвенной экосистемы, их массовое развитие приводит к оздоровлению почвы вследствие:

- накопления «биологического» азота, витаминов, аминокислот, ростовых веществ,
- снижения токсического действия поллютантов,
- фитосанитарного эффекта,
- улучшения плодородия.

Кроме того, цианобактерии способны оказывать ризогенный эффект, положительно действуя на корневую систему растений, стимулируют прорастание семян, образуют искусственные ассоциации с агрономически полезной микрофлорой.

Широкое распространение цианобактерий в полевых условиях, быстрые темпы их роста и положительное влияние на урожай обусловили попытки использования их для повышения почвенного плодородия. Известно использование на рисовых полях азотфиксаторов, а также:

1) Внесение в почву цианобактерий, выращенных вне ее — инокуляция семян. Эффект зависит от удобрения и повышается при одновременном внесении кальция и фосфора.

2) Поддержание и стимуляция роста цианобактерий в почве. В разных почвах усиление роста может быть достигнуто разными способами. Например, улучшение щелочных почв при помощи цианобактерий, развитие которых стимулировалось длительным затоплением полей. Способствуют росту цианобактерий известкование и удобрение суперфосфатом на почвах, бедных фосфором. В дерново-подзолистых почвах внесение органических удобрений благоприятствует азотфиксаторам.

3) Использование цианобактерий для изготовления комплексных бактериальных удобрений. Например, азотобактерин с добавлением цианобактерий более эффективен, чем отдельно взятый азотобактерин.

Консорциум – это совокупность или ассоциация двух или более организмов.

До 70-х годов прошлого столетия стратегия и тактика научного поиска в вопросах использования в сельском хозяйстве микроорганизмов основывалась на изучении и применении чистых культур (одновидовых популяций) микробов. Практика их применения показала в большинстве случаев малую эффективность биопрепаратов, основанных на монокультурах, что объяснялось рядом причин. Прежде всего, инокулят вносился в почву, достаточно обогащенную аборигенной микрофлорой сходного действия, немедленно вступающей с ним в конкурентные взаимоотношения. Это вызвало, наряду с отрицательным влиянием некоторых абиотических факторов, снижение эффективности приема из-за плохого приживания инокулюма. Сам принцип использования одновидовых популяций предполагает одностороннее действие, не исключающее тупиковых ситуаций в биохимических, деградиционных и трофических цепях. Подобные ситуации раньше всего проявились в области биодеградаци и биодетоксикации различных стойких ксенобиотиков, в производстве жидкого и газообразного биотоплива, комплексной переработки сырья. Известный скептицизм по применению биопрепаратов на основе азотобактера,

фосфобактерий, силикатных бактерий и других был основан на частом отсутствии ожидаемого эффекта. Пересмотр принципов классической биотехнологии, основанной на применении чистых культур микроорганизмов, базируется на понимании запросов почвенного плодородия, необходимого для возобновления ресурсов.

Показано, что экобиотехнологический потенциал микроорганизмов проявляется полнее всего в консорциумах. Производства, основанные на применении микробных сообществ, в десятки раз превосходят по экономической значимости производства, основанные на чистых культурах.

Отмечено преимущество консорциумов микроорганизмов перед монокультурами: универсальность (поливалентность); способность к саморегуляции за счет изменения соотношения численности видов, входящих в консорциум; способность утилизировать неоднородные по составу субстраты; возможность использования более бедных и менее ценных питательных сред за счет обогащения их продуктами жизнедеятельности микроорганизмов – партнеров; более полное использование функциональных возможностей микроорганизмов; более низкая стоимость, экономичность; возможность создания эффективных биологических систем по принципу цепных реакций в многочисленных производствах, связанных с микробиологией. Таким образом, амплитуда действия консорциумов значительно превышает эффективность монокультур.

При составлении консорциумов необходимо учитывать, что взаимодействия партнеров могут идти по типу аддитивности, синергизма или антагонизма или переходить на уровень симбиотических отношений.

Заманчивость создания консорциумов между цианобактериями и гетеротрофными бактериями основана на соображении дополнительного обогащения среды источниками азота и углерода за счет цианобактерий, что открывает перспективу использования более бедных и менее ценных питательных сред. Естественный цианобактериальный консорциум, вероятно, является одной из наиболее примитивных форм симбиотического существования, так как фототрофный компонент вступает в факультативный симбиоз со многими микроорганизмами.

К попыткам составления консорциумов микробов на основе цианобактерий не могут быть отнесены попытки механического смешения разных видов микробов

перед инокуляцией ими семян, растений, почвы из-за непредсказуемости реакций естественного цианобактериального консорциума, состоящего из многочисленных партнеров, и не изученных взаимоотношений бактерий-спутников и цианобактерий, с одной стороны, и предлагаемых компонентов – с другой. На этом основании был сделан вывод, что в условиях неполивного земледелия инокуляция почвы цианобактериями мало эффективна и дальнейшие испытания этого приема на неорошаемых почвах, по-видимому, малоперспективны.

Таким образом, несмотря на очевидную перспективность смешанных культур микроорганизмов при создании биопрепаратов, вопросы их устойчивого существования разработаны недостаточно. В центре нашего внимания оказались цианобактерии, являющиеся причинными агентами азотфиксации. В определенные периоды в почвах зоны умеренного климата процесс азотфиксации осуществляется в большей мере цианобактериями, а не хемотрофным почвенным компонентом микробиоты. Устойчивость этих организмов к неблагоприятным условиям определяет широкую амплитуду их распространения. Автономность от наличия источников связанного азота и органических соединений углерода в среде обуславливает дешевизну и упрощение технологии культивирования этих организмов. Новое направление работ по использованию их в сельском хозяйстве умеренного климата началось в связи с выяснением того, что цианобактерии в природных условиях обитают в сложных сообществах с разнообразной микрофлорой, являясь центрами микрокосмов, и что у различных видов цианобактерий отсутствует видовая специфичность бактерий-спутников, населяющих околочлеточную слизь. Поэтому возможна замена естественной микрофлоры слизистых чехлов на программируемую полезную микрофлору. Цель такой манипуляции – капсулирование вселенцев в слизи цианобактерий с временным их обеспечением доступной пищей за счет прижизненных выделений цианобактериальных клеток и материала слизистых чехлов. Предполагается, что искусственные композиты аддитивно или по типу синергического эффекта увеличат азотфиксацию.

Естественно, что составление запрограммированных композитов на основе цианобактерий, возможно только в случае работы с аскеническими культурами последних.

Особенности культивирования цианобактерий

Цианобактерии все чаще используются исследователями в качестве объекта для выяснения особенностей таких важных биологических процессов, как фотосинтез, дыхание, азотфиксация, гетеротрофная ассимиляция углерода и другие. Но, прежде чем изучать объект, надо его получить и сохранить для изучения. Поэтому мы неизбежно сталкиваемся с трудностями выделения и поддержания этих организмов в лабораторных культурах.

Широкое распространение цианобактерий в природе делает легкодоступным получение материала для выделения их из самых различных источников. Садовая и лесная почва, речная и озерная вода, болотная жижа и почвенные корочки пустынь, налет на камнях и стенках аквариумов могут служить источниками получения многочисленных и разнообразных форм цианобактерий.

Часто выбор источника может определяться задачами, которые ставит перед собой исследователь. Например, поиски цианобактерий, окисляющих соединения серы начинают с отбора материала из серных источников или илов с высоким содержанием сероводорода. Выяснение влияния температурного фактора на пигментный состав цианобактерий начинают с отбора материала из различных источников, но в широком температурном диапазоне, охватывающем крайние условия жизни – горячие источники и вечномерзлотные грунты.

Из отобранного материала необходимо получить накопительную культуру. Для этого обычно используют простую по составу минеральную среду, варьируя степень освещенности в области от 600 до 3000 люкс. Затруднения на этом этапе создает малая элективность сред и условий культивирования цианобактерий. В некоторых случаях, когда цианобактерии выделяют из особых мест обитания (горячие источники, поверхность льда, сероводородный источник), полезно сохранить в среде фактор, создающий или поддерживающий эти условия. Особенно широко распространена среди цианобактерий способность переносить температуры порядка 30-35 и даже 40 °С, что позволяет уже на первом этапе избавиться от большого числа форм сопутствующей микрофлоры. Еще более облегчается задача, если необходимо накопить цианобактерии, фиксирующие азот. В этом случае исключение из состава сред азотсодержащих соединений с высевом образца на жидкие и твердые питательные среды создает надежную элективность, что позволяет быстро получить

хорошо очищенную культуру.

Обычно в достаточном количестве материал накапливается к 20 – 30-му дню после внесения в минеральную среду взятых из природы проб, причем в течение первых 7 – 15 дней сколько-нибудь заметного развития цианобактерий часто не наблюдается.

Накопив достаточное количество материала (судят об этом по интенсивному позеленению среды, появлению пленки на поверхности жидкости или на стенках колб, а также по результатам микроскопирования), следует приступить к выделению чистой культуры. Для этого нужно тем или иным способом получить отдельные нити или клетки цианобактерий и перенести их в стерильную питательную среду. В лаборатории этого можно добиться с помощью микроманипулятора или капельным методом, сделав ряд последовательных разведений накопительной культуры. В полевых условиях для отделения нитей, гормогоний или спор цианобактерий используют обычную капиллярную пипетку, контролируя действия небольшим увеличением микроскопа или лупой. При работе с подвижными нитчатými формами отделение кончиков нитей или гормогониев производят на поверхности твердых питательных сред также под контролем малого увеличения микроскопа. Выращивание накопительной культуры на твердой питательной среде дает возможность по характеру роста на поверхности разделить между собой выделяемые виды цианобактерий.

Трудность получения бактериологически чистых культур цианобактерий вызвана тем, что клетки и нити их почти всегда окружены толстым слоем слизи, укрывающим бактериальные организмы-спутники. С помощью ряда пересевов на минеральных средах можно легко избавиться от случайных спутников. Гораздо труднее очистить культуру цианобактерий от сопутствующих микроорганизмов, обитающих в околочлеточной слизи.

Для борьбы с бактериальным загрязнением предлагались разнообразные методы: выращивание культур на кремнекислом геле; на средах, содержащих вещества, способствующие развитию и выявлению загрязняющих форм; обработка цианобактерий антисептиками и антибиотиками; ультрафиолетовое облучение культур ртутно-кварцевой лампой. Но эти методы результативны лишь в случае бактериальных загрязнений, они оказываются неэффективными по отношению к

слизевым формам бактерий, так как последние хорошо защищены слизью, окружающей клетки цианобактерий.

Поэтому важно в ходе очистки культур цианобактерий получать свободные от слизи гормогонии или обрывки нитей до обработки культур различными антибактериальными агентами. Японские ученые для ликвидации бактериальных загрязнений используют дробление комковатых культур цианобактерий на магнитной мешалке с последующей обработкой их ультрафиолетовыми лучами. Для очистки культур цианобактерий от сопутствующих бактерий самое главное – это получение нитей или гормогоний цианобактерий, свободных от слизи. Освобождение нитей цианобактерий от осемененных бактериями-спутниками слизистых влагилиц может быть достигнуто различными способами. Для подвижных форм водорослей полезен метод, дающий возможность быстро получать на агаровых пластинках молодые, бесслизевые гормогонии. Разбегающиеся по поверхности агара нити осцилляторий в этом случае сами отделяли свои гормогонии на периферии. Для неподвижных форм этот метод непригоден.

Для получения бактериально чистых культур применяют более универсальный метод фильтрования жидких культур под вакуумом через стеклянные фильтры № 1 или № 2. Через поры проходят только гормогонии, споры и короткие обрывки нитей.

Возможно получение бактериально чистых культур цианобактерий непосредственно путем пересева из суспензий фильтрата в подходящую питательную среду. Более результативна обработка суспензии бесслизевых клеток какими-нибудь бактериальными агентами или их комбинацией. Необходимо подобрать такие агенты, которые, будучи губительными для слизевых бактерий, предварительно выделенных в чистых культурах, были бы безвредны для самих цианобактерий.

Для проверки чистоты полученных культур применяют высевы из жидких культур цианобактерий на среду Эшби для азотобактера, среду Виноградского для нитрифицирующих бактерий, среду Хетчинсона для целлюлозоразрушающих бактерий или среду Ларсена для фотосинтезирующих бактерий. Отсутствие на них бактериального роста и микроскопический контроль однородности культур цианобактерий гарантируют бактериологическую чистоту культуры и делают ее абсолютно пригодной для сравнительно-физиологических и биохимических работ.

Для выделения и культивирования цианобактерий предложены

многочисленные минеральные среды, в состав которых входит ограниченный набор соединений, призванный удовлетворить потребности конструктивных процессов фотосинтезирующих организмов. Отличительной особенностью рекомендуемых сред является полное отсутствие элективности. В составлении сред отразилась лишь необходимость удовлетворения потребности цианобактерий в самых обычных биогенных элементах, необходимых для роста и развития любого живого организма.

Из всех существующих фотосинтезирующих организмов цианобактерии самые нетребовательные к составу сред. Для них разумно использовать следующую комбинацию: свет + невозможно плохие условия среды, в которых *уже* не развиваются другие фотосинтезирующие организмы, но *еще* развиваются цианобактерии.

Элективная среда не является наилучшей для получения максимальных урожаев культуры. При выделении и поддержании культур в условиях лабораторий надо стремиться к использованию наиболее простых по составу питательных сред [30].

Для выделения и поддержания культуры цианобактерий рекомендованы среды следующего состава (на 1 литр воды):

Среда Громова № 6:

1. KNO_3	1 г.
2. K_2HPO_4	0,2 г.
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 г.
4. CaCl_2	0,15 г.
5. NaHCO_3	0,2 г.
6. Микроэлементы	1 мл.
7. Агар	8 г.
8. Вода стеклянная	

Примечание:

- 1) Приведенные цифры для компонентов среды указаны из расчета на 1 литр
- 2) Для азотфиксирующих цианобактерий исключаем из состава среды KNO_3

Среда Гусева

(для азотфиксирующих цианобактерий):

1. K_2HPO_4	0,05 г.
2. $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,1 г.
3. NaCl	0,1 г.
4. Вода водопроводная	

Среда М

(для азотфиксирующих цианобактерий):

1. K_2HPO_4	0,04 г.
2. $MgSO_4$	0,25 г.
3. $NaHCO_3$	0,2 г.
4. $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0238 г.
5. $Fe_2(SO_4)_3$	0,02 г.
6. Цитрат Na	0,165 г.
7. Микроэлементы	1 мл.
8. Агар	20 г.
9. Вода стеклянная	

Запросы цианобактерий должны быть удовлетворены прежде всего в металлах K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} и биогенных элементах P, S, N. Источники углерода и азота диффундируют из воздуха, чему способствует ежедневное перемешивание содержимого колб в течение 5 – 10 минут. Микроэлементы попадают в среду с водопроводной водой (предварительно прокипяченной и процеженной через вату).

После добавления к водопроводной воде вышеуказанных количеств соединений среду стерилизуют в автоклаве при одной атмосфере. Среду, которая после стерилизации подщелачивается до pH 7,8 – 8,0, инокулируют цианобактериями и полученную таким образом культуру помещают в люминостат с температурой 30 °С и освещенностью 3000 – 4000 люкс.

Изыскание оптимальных условий культивирования для цианобактерий важно в связи с проблемой их массового культивирования.

Скорость роста цианобактерий не лимитируется скоростью диффузии из воздуха в жидкость молекулярного азота и углекислого газа. Компоненты сред не исчерпываются до конца и, следовательно, также не могут лимитировать рост культуры. Случаи массового цветения цианобактерий в водоемах вынуждают

признать, что создаваемые условия роста на минеральных средах далеки от оптимальных и не способны обеспечить урожай, соизмеримые с наблюдающимися в природе.

Массовое развитие цианобактерий в природе связывают с увеличением в водоемах содержания органических соединений углерода. Оно вызывается видами, использующими в своем развитии органические субстраты.

Отмечалось благоприятное влияние на развитие цианобактерий таких факторов как продувание среды воздухом, перемешивание и т. д. как следствие механического выравнивания концентрации кислорода в среде, в ходе которого удаляется избыток образующегося на свету кислорода. Добавление в среду глюкозы также действует в указанном направлении, поскольку потребление глюкозы на свету сопровождается снижением концентрации кислорода, растворенного в культуральной жидкости.

В большинстве случаев калориметрические и нефлометрические методы неприемлемы для оценки биомассы из-за большой гетерогенности культур (особенно нитчатых форм). Нежелательны также методы, связанные с высушиванием или сжиганием бактерий, требующие большой затраты времени, хотя и довольно точные. Наиболее целесообразными являются методы, учитывающие нарастание биомассы по объему. Подразумевается осаждение культур и определенное уплотнение осадка при постоянном режиме центрифугирования. Стандартизация процедур позволяет определить соотношение между сухим весом культуры и занимаемым ею объемом, чтобы использовать установленную зависимость при массовых определениях урожая культуры объемным методом с последующим пересчетом на сухой вес.

Часто после длительного пребывания в лаборатории цианобактерии содержат, хотя и в небольшом количестве, жизнеспособные клетки спутников. Возможно, что после соответствующей обработки некоторое количество неспорозных бактериальных клеток остается в состоянии «мнимой смерти», временно теряя способность к размножению. После более или менее длительного пребывания в таком состоянии они снова приобретают способность размножаться. Поэтому аскенические культуры цианобактерий должны периодически проверяться на отсутствие в них сопутствующих бактерий.

Аскенические культуры цианобактерий рекомендуют инкубировать на твердых средах. Планктонные организмы и быстрорастущие нитчатые формы поддерживают в

жидких средах. Азотфиксирующие штаммы хранят на среде без азота, так как на полноценной среде они теряют способность фиксировать атмосферный азот.

Для сохранения культур применяются периодические пересевы на питательные среды через 2 – 3 месяца. В течение двух первых недель после посева культуры содержатся в люминостане при освещении люминесцентными лампами 10 – 12 часов в сутки при интенсивности света 3 – 4 тыс. люкс и температуре около 25 °С. Последующее время культуры сохраняются на рассеянном свете (при естественном освещении) и температуре 10 – 15 °С. Регулярно проводится проверка состояния культур, которая показывает их стабильность.

Альго-цианобактериальные группировки почв

Подавляющее большинство водорослей, населяющих почву, имеют микроскопические формы. Целенаправленное исследование почвенных водорослей началось в 20 годах XX века. Благодаря многочисленным работам как отечественных, так и зарубежных альгологов накоплены сведения о составе и структуре водорослевых сообществ, их роли в почвенно-биологических процессах, изучена флора почвенных водорослей различных географических районов.

В настоящее время общее количество обнаруженных в почве видов водорослей составляет около двух тысяч. Предположительно это менее 10% существующих в природе видов. Ежегодно альгологии выявляют все новые и новые виды. В почве преимущественно развиваются водоросли четырех отделов: Chlorophyta (зеленые), Xanthophyta (желто-зеленые), Bacillariophyta (диатомовые) и Cyanophyta (сине-зеленые). Значительно реже встречаются красные (Rhodophyta) и евгленовые (Euglenophyta) водоросли. В отличие от всех остальных водорослей сине-зеленые относятся к прокариотам, так как их клетки не имеют морфологически обособленного ядра. Поэтому в последнее время эту группу стали относить к бактериям и рассматривают как цианобактерии (Cyanobacteria).

Численность водорослей в разных местообитаниях колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов клеток в 1 грамме почвы. В особо благоприятных условиях массовые разрастания водорослей видны на поверхности почвы как зеленые, темно-зеленые или черные пятна разнообразных форм и размеров. В отличие от численности биомасса водорослей редко достигает больших значений. В среднем она изменяется в пределах 30-200 кг/га. Синтез и трансформация органического

вещества водорослей является очень динамичным процессом. Биомасса водорослей способна обновляться в течение 3-5 суток, поэтому реальный вклад водорослей в первичную продукцию экосистемы в сотни и тысячи раз больше величины биомассы.

Почвенные водоросли первыми из растений поселяются на безжизненных субстратах: скальных поверхностях высокогорий, промышленных отвалах, на территориях подвергнувшихся катастрофическим воздействиям (извержениям вулканов, атомным взрывам, пожарам и т.п.) и тем самым облегчают расселение других организмов. В то же время, водоросли последними из растений «отступают» под давлением неблагоприятных факторов природного и антропогенного происхождения. В этих условиях гибель сообщества водорослей (альгоценоза) приводит к разрушению всего биоценоза.

При ослаблении развития высшей растительности под влиянием промышленного освоения территорий возрастает роль почвенных водорослей как составной части автотрофного блока экосистемы. Это находит свое выражение в увеличении их видового разнообразия и количественного развития. Так, около Карабашского медеплавильного комбината (Челябинская область), на территориях с угнетенными высшими растениями численность почвенных водорослей возросла в 4 раза, биомасса - более чем в 7 раз, продукция - в 8 раз, скорость обновления органического вещества - в 12 раз по сравнению с фоновыми участками. По-видимому, увеличение видового разнообразия и интенсивности развития почвенных водорослей в фитоценозах, деградирующих под воздействием антропогенных факторов, является одним из механизмов, поддерживающих стабильность автотрофного блока и всей экосистемы в целом.

В сформированных экосистемах, располагаясь между высшими растениями, занимая пустые пространства, захватывая неподходящие для более высокоорганизованных растений места, они увеличивают количество аккумулированной зелеными растениями солнечной энергии. Благодаря почвенным водорослям осуществляется отмеченное В.И.Вернадским растекание "живого вещества" по поверхности Земли.

Развиваясь на поверхности и в толще почвы, водоросли оказывают влияние на ее физико-химические свойства. Они синтезируют и выделяют в окружающую среду разнообразные вещества, изменяют рН почвенного раствора, улучшают водный

режим и аэрацию почвы, препятствуют ее эрозии. Через избирательное поглощение и концентрирование в своих клетках отдельных химических элементов, в том числе и радиоактивных, влияют на солевой баланс и состав микроорганизмов в почве. Многие виды сине-зеленых водорослей (цианобактерий) способны к азотфиксации. По некоторым данным, за счет азотфиксации сине-зеленых водорослей накопление азота для почв умеренной зоны составляет от 2 до 51 кг/га в год.

Кроме того водоросли служат пищей для гетеротрофных организмов, участвуют в сложных взаимоотношениях с другими живыми компонентами экосистемы. В частности, с высшими растениями они конкурируют за элементы минерального питания, поселяясь на муравейниках, выступают как комменсалы, в то же время сами дают «пищу и кров» живущим в их слизистых чехлах бактериям и микроскопическим грибам.

При использовании водорослей для оценки текущего состояния почвы можно применять два подхода. Первый (альготестирование) заключается в том, что в исследуемую почву (или водную вытяжку из нее) вносят водоросли и по их реакции судят о почве. Второй (альгоиндикация) предусматривает оценку качества почвы по состоянию водорослей, живущих в ней. Альгоиндикацию можно проводить на разных уровнях: организменном, популяционном, ценоотическом.

Развитие микроорганизмов в почвах урбанизированных территорий происходит в специфических условиях, резко отличных от условий природных экосистем данного региона. На территории города практически не остается естественных почв. Антропогенное воздействие на почву проявляется в неблагоприятных технических, физических, химических и биологических процессах, приводящих к нарушению почвенного покрова, загрязнению, деградации. Характерной особенностью городских почв, в первую очередь, является их значительное загрязнение различными поллютантами (тяжелые металлы, нефть и нефтепродукты, бытовой мусор, ксенобиотики). Кроме того, следствием воздействия городской среды становится переуплотнение почвы, сопровождающееся нарушением водно-воздушного и температурного режима, изменение кислотности, обеднение или обогащение почв элементами минерального питания. Следствием внесения противогололедных реагентов и минеральных удобрений при озеленении становится засоление. Усиленная рекреационная нагрузка приводит к вытаптыванию, созданию

пожароопасной ситуации (сжиганию травы и мусора во дворах осенью и весной), физическому уничтожению почвы.

Следовательно, формирование микробных комплексов в урбаноземах подчиняется воздействию не столько природных факторов, сколько мобилизацией адаптационных возможностей организмов для выживания в среде, подверженной влиянию стресс факторов. В результате формируются микробные комплексы и ценозы, обладающие рядом новоприобретенных признаков.

Поэтому изучение микробных комплексов антропогенно – нарушенных городских почв представляет интерес для получения максимально полной характеристики данного компонента педобионтов и, следовательно, о роли этой группы организмов в биологическом состоянии почв. При этом изучение механизмов адаптации микроорганизмов к неблагоприятным антропогенным факторам может служить теоретической основой создания технологий биоремедиации городских почв на основе микробных препаратов.

Исследования, проводимые в городских агломерациях в последние десятилетия, показывают, что почвенные микробиоценозы в целом включают те же группы микроорганизмов, что и почвы фоновых территорий. Однако наблюдаются существенные изменения в структуре и функционировании данных микробиоценозов.

Урбанизация обуславливает увеличение видового разнообразия почвенных водорослей за счет появления новых экологических ниш для их существования. При урбанизации происходит цианофитизация (увеличение доли цианобактерий) альгогруппировок при одновременном снижении степени развития желто-зеленых водорослей.

Достаточно полное изучение почвенных альгогруппировок урбозкосистем выполнено в ряде городов России: Уфа и другие города Башкортостана, Красноярск, Челябинск, Новосибирск, Ижевск. Среди наиболее значимых выводов проведенных исследований можно отметить следующие:

- антропогенное загрязнение часто приводит к появлению аномальных форм зеленых водорослей и атипичных форм цианобактерий;
- у цианобактерий намечается тенденция усиления термофильных форм с продуцированием окрашенных метаболитов;

- представители эпифитной городской альгофлоры имеют широкий аппарат приспособленных признаков, в частности, для них обезвоживание до воздушно-сухого состояния является нормой;

- в спектре жизненных форм почвенных водорослей городских рекреаций ведущая роль принадлежит С- и Ch-формам (Ch-форма - к ней относятся одноклеточные виды-убиквисты, представители зеленых и желтозеленых водорослей, устойчивых к экстремальным условиям);

- выявлены виды, чувствительные к антропогенной нагрузке, и виды – толеранты, адаптированные к жизни в условиях антропогенного стресса.

В районах размещения промышленных предприятий города изучались пробы с участков Биохимического завода, завода «Искож», станкостроительного завода, Лепсе, ОЦМ, ТЭЦ – 5.

В изученных пробах выявлен 71 вид почвенных водорослей, в том числе Cyanophyta – 32 вида (45,1%), Bacillariophyta – 11 видов (15,5%), Xanthophyta – 3 вида (4,2%), Eustigmatophyta – 2 вида (2,8%), Chlorophyta – 23 вида (32,4%). По числу видов преобладают цианобактерии и зеленые водоросли. Наибольшее видовое разнообразие представителей данных отделов отмечено и другими исследователями для промышленных зон городов. Чувствительные к загрязнению желтозеленые водоросли встречаются единично в районе завода «Искож», Биохимического завода и полностью отсутствовали в районе Станкостроительного завода.

Доминирующий комплекс сообществ цианобактерий составляют цианобактерии, диатомовые и зеленые водоросли: *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium autumnale*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Hantzschia amphioxys*, *Luticila mutica* var. *mutica*, *L. Mutica* var. *Nivalis*, *Chlamydomonas gloeogama*, *Chlorella vulgaris*.

Встречаемость видов (60-100%) на данных территориях встречаются виды: *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium autumnale*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Navicula pelliculosa*, *Hantzschia amphioxys* var. *amphioxys*, *Chlamydomonas gloeogama*, *Chlorella vulgaris*, *Stichococcus minor*, *Stichococcus chodatti*, *Protoderma viridae*.